

**Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute  
in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*  
und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung  
kompatibler Solute in *Bacillus subtilis***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Gudrun Holtmann**  
aus Telgte

Marburg/Lahn 2002

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 1999 bis Oktober 2002 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am:

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. R.K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung am:

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen erstellt und Manuskripte vorbereitet:

**Holtmann, G., Boiangiu, C.D., Brill, J., Hoffmann, T., Kuhlmann, A.U., Moses, S., Nau-Wagner, G., Pica, N. und Bremer, E.** (2003). Physiological and molecular responses of *Bacillus subtilis* to hypertonicity: utilization of evolutionarily conserved adaptation strategies. In: A. Ventosa (Ed.), Halophiles. (Im Druck).

**Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N. Bremer, E.** (2003). KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup>-uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in the adaptation to hypertonicity. Journal of Bacteriology (im Druck).

**Holtmann, G. und Bremer, E.** Thermoprotection of the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* by the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. Manuskript in Vorbereitung

**Holtmann, G. und Bremer, E.** Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of the Opu-transporters. Manuskript in Vorbereitung.

**Schiefner, A., Breed, J., Bösner, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W., Bremer, E.** Structure of the osmoprotectant binding protein ProX from *Escherichia coli* at 1.6 Å resolution: cation- $\pi$  interactions as determinants of glycine betaine and proline betaine binding. Manuskript in Vorbereitung.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Erhard Bremer für die Überlassung des interessanten Themas, das beständige Interesse am Fortgang der Arbeit und die Diskussionsbereitschaft bedanken.

André Schiefner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfram Welte in Konstanz danke ich für die Kristallisation und Lösung der Kristallstruktur von ProX.

Für den zur Verfügung gestellten *A. fulgidus*-Stamm VC16 gilt mein Dank Prof. Dr. K.O. Stetter (Universität Regensburg).

Dr. Gerd Mander bin ich für die Vermittlung anaerober Arbeitstechniken, die hilfreichen Tipps zur Anzucht von *A. fulgidus* und den unermüdlichen HPLC-Pannennotdienst sehr dankbar.

Dr. Antonio Pierik möchte ich für die Unterstützung bei der Fluoreszenzspektroskopie danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Bremer für die angenehme Zusammenarbeit und die zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Jeanette Brill für die schöne Zeit im ersten Labor, die unterhaltsamen Mensagänge und den sportlichen Ausgleich im Vitakraft.

Mein größter Dank geht an Gerd und meine Familie, die mich während der gesamten Zeit motiviert und liebevoll unterstützt haben.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg,

# Lebenslauf

---

Zur Person

Gudrun Holtmann  
geboren am 06.03.1975 in Telgte  
ledig

---

## Schulbildung

---

1981-1985	Grundschule in Münster
1985-1994	Gymnasium St. Mauritz in Münster, Abschluss Abitur

## Studium

---

1994-1996	Biologiestudium an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster
1996-1999	Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg
09/1996	Vordiplom
09/1999	Diplom  Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Zellbiologie Titel der Diplomarbeit: Kaliumaufnahme in <i>Bacillus subtilis</i>
seit 10/1999	Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Bremer  Titel der Dissertation Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon <i>Archaeoglobus fulgidus</i> und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in <i>Bacillus subtilis</i>
10/1999 – 09/2002	Mitglied des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“

Marburg, im Dezember 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungen</b>	1
<b>I. ZUSAMMENFASSUNG</b>	2
<b>II. EINLEITUNG</b>	3
<b>1. Anpassung von Mikroorganismen an variierende Umweltbedingungen</b>	3
1.1 Anpassung an hohe Osmolarität	3
1.2 Kompatible Solute: Natur und Funktionsweise	4
1.3 Kompatible Solute in hyperthermophilen Archaea	7
1.4 Akkumulation kompatibler Solute in <i>B. subtilis</i>	9
1.4.1 Synthese des kompatiblen Solutes Prolin	9
1.4.2 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt	11
1.5 Efflux von Soluten nach einem hypoosmotischen Schock	14
1.6 Aufnahmesysteme für kompatible Solute in anderen Bacteria und Archaea	15
1.7 Aktivierung der Aufnahmesysteme für kompatible Solute	19
1.8 <i>Archaeoglobus fulgidus</i> und seine Reaktion auf osmotischen Stress	20
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	22
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b>	23
<b>1. Chemikalien und Reagenzien</b>	23
1.1 Verwendete kompatible Solute	23
1.2 Radiochemikalien	23
<b>2. Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide</b>	23
<b>3. Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen</b>	25
3.1 Medien	25
3.1.1 Vollmedien	25
3.1.2 Minimalmedien	25
3.2 Kompatible Solute und Antibiotika	27
3.3 Sterilisation	28
3.4 Wachstum	28
3.4.1 Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>A. fulgidus</i>	28
3.4.4 Bestimmung der Zelldichte	28
<b>4. Molekularbiologische und genetische Methoden</b>	29
4.1 Präparation von DNA und Gesamt-RNA	29
4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA	29
4.1.2 Präparation von chromosomaler DNA	29
4.1.3 Präparation von Gesamt-RNA	29
4.1.4 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	29
4.2 Klonierungstechniken	30
4.2.1 Restriktion von DNA	30
4.2.2 Agarosegelelektrophorese	30
4.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
4.2.4 Ligationen	30
4.2.5 Transformation von <i>E. coli</i>	30
4.3 Polymerasekettenreaktion und Bestimmung der Nukleotidsequenz	31
4.3.1 Polymerasekettenreaktion	31
4.3.2 DNA-Sequenzierung	31
4.4 Analyse von Gesamt-RNA durch Northern-Transfer und –Hybridisierung	31

4.4.1 Herstellung der RNA-Sonden	31
4.4.2 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)	32
4.5 Analyse von mRNA-Startpunkten durch Primer-Extension	32
4.6 Computergestützte Sequenzanalysen	32
4.7 Konstruktion von Plasmiden	33
<b>5. Biochemische Methoden</b>	33
5.1 Heterologe Überexpression und Reinigung von ProX aus <i>A. fulgidus</i>	33
5.1.1 Heterologe Überexpression von ProX	33
5.1.2 Metabolisches Labeling von ProX mit Selenomethionin	33
5.1.3 Periplasmatischer Aufschluss von <i>E. coli</i> und Reinigung von ProX	34
5.2 Herstellung eines Antiserums gegen das heterolog produzierte ProX	35
5.3 Bindestudien mit dem heterolog produzierten ProX	35
5.3.1 Bindestudien mit radioaktiv markiertem Glycin Betain	35
5.3.2 Bestimmung der Affinitätskonstanten ( $K_D$ ) durch Fluoreszenzspektroskopie	35
5.4 Herstellung von Rohextrakten aus <i>A. fulgidus</i> und <i>E. coli</i>	36
5.5 Bestimmung des Proteingehaltes	36
5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
5.7 Immunodetektion von Proteinen (Western-blot Analyse)	37
5.7.1 Transfer von Proteinen auf Membranen	37
5.7.2 Detektion von ProX mit einem spezifischen Antiserum	37
5.7.3 MALDI-ToF Massenspektrometrie	38
5.8 Messung der Aufnahme [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Verbindungen	38
5.8.1 Bestimmung der Transportrate von $^{14}\text{C}$ -Glycin Betain und $^{14}\text{C}$ -Glutamat	38
5.8.2 Messung des Glutamat- bzw. Glycin Betain-Pools	39
5.9 Analyse von Zellextrakten mit $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie	39
5.10 HPLC-Analysen von Aminosäuren aus <i>B. subtilis</i> Zellextrakten	39
5.10.1 Zellzucht und Mikroextraktion nach Bligh und Dyer	39
5.10.2 Vorsäulenderivatisierung mit FMOc	40
5.10.3 HPLC-Analyse	40
<b>IV. ERGEBNISSE</b>	42
1. Biochemische und physiologische Charakterisierung des ProU-Transporters aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	42
1.1 Charakterisierung des ProU-Transporters	42
1.1.1 Analyse der offenen Leserahmen des <i>proU</i> -Genclusters	42
1.1.2 Heterologe Überproduktion und Reinigung von ProX aus <i>A. fulgidus</i>	44
1.1.3 Bestimmung der Substratspezifität von ProX	45
1.1.4 Temperaturabhängigkeit der Substratbindung	47
1.1.5 Bestimmung der Affinitätskonstanten ( $K_D$ ) von ProX	48
1.1.6 Lokalisation und Quantifizierung von ProX in <i>A. fulgidus</i>	50
1.1.7 Kristallisation und Lösung der Kristallstruktur von ProX	52
1.2 Physiologische Rolle des ProU-Transporters in <i>A. fulgidus</i>	54
1.2.1 Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von <i>A. fulgidus</i> bei osmotischem Stress und auf die Expression von ProX	54
1.2.2 Mögliche Rolle von Glycin Betain als C- oder N-Quelle	56
1.2.3 Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von <i>A. fulgidus</i> jenseits des Wachstumsoptimums	56
1.2.4 Einfluss von Hitzestress auf die Expression von ProX	59
1.2.5 Versuche zur Glycin Betain-Transportaktivität	59
1.2.6 Komplementation einer Glycin Betain-Aufnahmedefekten <i>E. coli</i> Mutante mit ProU aus <i>A. fulgidus</i>	60



<b>2. Thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute in <i>B. subtilis</i></b>	63
2.1 Effekt von Glycin Betain auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> bei 52°C	63
2.2 Beteiligung der Opu-Transporter an der Aufnahme von Glycin Betain unter Hitzestress	65
2.3 Wirkung verschiedener kompatibler Solute auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> bei 52°C	66
2.4 Cholin ist nicht <i>per se</i> hitzeprotektiv	67
2.5 Einfluss von Hitzestress auf die Expression der <i>opu</i> -Gene	68
2.6 Bestimmung der Glycin Betain-Aufnahme unter Hitzestress	71
2.7 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven GB-Konzentration	74
2.8 Untersuchungen zur Beteiligung <i>de novo</i> synthetisierter Solute an der Hitze-adaptation von <i>B. subtilis</i>	75
2.8.1 Northern-Analyse der <i>proBA</i> und <i>proHJ</i> -Transkripte	75
2.8.2 Analyse des Startpunktes der <i>proHJ</i> mRNA	76
2.8.3 Charakterisierung des Phänotyps einer <i>proHJ</i> -Mutante bei Hitzestress	78
2.8.4 Bestimmung des zellulären Prolin- und Glutamat-Gehaltes	79
2.9 Glutamat fördert ebenfalls das Wachstum von <i>B. subtilis</i> bei 52°C	80
2.9.1 Bestimmung der Glutamat-Aufnahme	82
2.9.2 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven Glutamatkonzentration	84
<b>3. Untersuchungen zur Beteiligung des alternativen Sigmafaktors <math>\sigma^B</math> bei der Adaptation an supraoptimale Wachstumsbedingungen</b>	85
<b>V. DISKUSSION</b>	87
<b>1. ProU ist ein Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter</b>	87
1.1 ProX – ein Bindeprotein für Glycin Betain und Prolin Betain	88
1.2 Temperaturverhalten von ProX	89
1.3 Struktur und Art der Substratbindung durch ProX	91
1.4 ProX ist vermutlich ein Lipoprotein	95
<b>2. Physiologische Rolle des ProU-Transporters</b>	97
2.1 Glycin Betain dient <i>A. fulgidus</i> nicht als Osmoprotektivum	97
2.2 Glycin Betain dient nicht als C- oder N-Quelle	98
2.3 ProU vermittelt die Aufnahme von GB zu thermoprotektiven Zwecken	98
<b>3. Die thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute <i>in vivo</i></b>	100
3.1 Die stabilisierende Wirkung kompatibler Solute auf Proteine	101
3.2 Die mögliche thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute auf Membran	103
<b>4. Transport und Nutzung kompatibler Solute bei Hitzestress in <i>B. subtilis</i></b>	104
<b>5. Der Einfluss <i>de novo</i> synthetisierter Solute auf die Hitzetoleranz</b>	107
<b>6. Hitzeabhängige Regulation von Genen</b>	109
<b>7. Die Rolle von Glutamat bei der Anpassung an supraoptimale Temperaturen</b>	112
<b>VI. LITERATUR</b>	114

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1:	Kompatible Solute aus (hyper)thermophilen Bacteria und Archaea	8
Abb. 2:	Synthesewege für Prolin in <i>B. subtilis</i>	10
Abb. 3:	Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i>	13
Abb. 4:	Schematische Darstellung des ProU Transporters und Organisation der Gene	43
Abb. 5:	Überproduktion und Reinigung von ProX	45
Abb. 6:	Substratspezifität von ProX	46
Abb. 7:	Temperaturabhängigkeit der Substratbindung	47
Abb. 8:	Emissionsspektren von ProX ohne Substrat und substratgesättigt	49
Abb. 9:	Bestimmung der Affinitätskonstanten von ProX für seine Substrate	50
Abb. 10:	Lokalisation und Quantifizierung von ProX in <i>A. fulgidus</i>	51
Abb. 11:	Kristalle von Selenomethionin markiertem ProX	52
Abb. 12:	Ribbon-Modell der ProX Struktur	53
Abb. 13:	Detailansicht der Substratbindetasche	54
Abb. 14:	Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von <i>A. fulgidus</i> bei NaCl-Stress	55
Abb. 15:	Einfluss der Osmolarität bzw. des Glycin Betaingehalts des Mediums auf die Expression von ProX	56
Abb. 16:	Einfluss von Glycin Betain bzw. Prolin Betain auf das Wachstum von <i>A. fulgidus</i> bei 83°C bzw. 90°C	58
Abb. 17:	Expression von ProX unter Hitzestress	59
Abb. 18:	Bestimmung der Glycin Betain-Aufnahme der <i>E. coli</i> -Mutante MKH13, die das <i>proU</i> -Gencluster aus <i>A. fulgidus</i> exprimiert	61
Abb. 19:	Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> bei 37°C und 52°C	64
Abb. 20:	<i>B. subtilis</i> nutzt auch unter Hitzestress die Opu-Transporter für die Aufnahme von Glycin Betain	65
Abb. 21:	Wirkung unterschiedlicher Solute auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> bei 52°C	66
Abb. 22:	Wachstum des Wildtypstammes JH642 und der Mutante JBB5 bei 52°C mit Cholin und Glycin Betain	68
Abb. 23:	Northernblotanalysen der <i>opu</i> -Transkripte unter Hitzestress	71
Abb. 24:	Bestimmung der Glycin Betain-Transportrate	72
Abb. 25:	Glycin Betain-Gehalt von <i>B. subtilis</i> Zellen unter verschiedenen Bedingungen	73
Abb. 26:	Halbmaximale hitzeprotektive Glycin Betain-Konzentration	74
Abb. 27:	Northernblotanalyse der <i>proHJ</i> - und <i>proBA</i> -Transkripte	76
Abb. 28:	Primer-Extension Analyse des <i>proHJ</i> -Transkriptes	77
Abb. 29:	Wachstumsverhalten der ProHJ-Mutante (JSB8) bei 52°C	79
Abb. 30:	Hitzeprotektive Wirkung von Glutamat	82
Abb. 31:	Glutamat-Aufnahme unter verschiedenen Bedingungen	83
Abb. 32:	Glutamat-Gehalt von <i>B. subtilis</i> Zellen unter verschiedenen Bedingungen	84
Abb. 33:	Halbmaximale hitzeprotektive Glutamatkonzentration	85
Abb. 34:	Northernblot-Analysen von <i>gsiB</i> und <i>ctc</i>	86
Abb. 35:	Vergleich der an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste in ProX aus <i>A. fulgidus</i> und ProX aus <i>E. coli</i>	93
Abb. 36:	Vergleich der Aminosäuresequenzen versch. Glycin Betain Bindeproteine	94
Tab. 1:	<i>E. coli</i> Stämme	23
Tab. 2:	<i>B. subtilis</i> Stämme	24
Tab. 3:	Plasmide	24
Tab. 4:	Oligonukleotide	24

Tab. 5:	Zusammensetzung der zehnfachen Basalsalzlösung (1 Liter)	26
Tab. 6:	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (1 Liter)	26
Tab. 7:	Zusammensetzung der Vitaminlösung (1 Liter)	27
Tab. 8:	Kompatible Solute und Antibiotika	27
Tab. 9:	Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele	37
Tab. 10:	Glutamat- und Prolingehalt von <i>B. subtilis</i> bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen	80

**ABKÜRZUNGEN**

ADAM	1-Aminoadamantan
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dpm	Zerfälle pro Minute ( <u>d</u> ecays <u>p</u> er <u>m</u> inute)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FMOC	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
IRD800	Infrared dye (Fluoreszenzfarbstoff für Oligonukleotide)
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight Massenspektrometrie
MCS	multiple cloning site
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
Spc <sup>r</sup>	resistent gegen Spectinomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet <sup>r</sup>	resistent gegen Tetracyclin

## I. ZUSAMMENFASSUNG

Kompatible Solute wurden erstmals in Zusammenhang mit der Osmostressantwort verschiedener Organismen identifiziert und seitdem auch als Osmoprotektiva bezeichnet. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass ihnen auch bei der Anpassung an andere widrige Bedingungen (Kälte, Hitze, Trockenheit) eine bedeutende Rolle zukommt und sie daher eher als generelle Stressprotektiva zu sehen sind. Im Reich der Bacteria sind Aufnahmesysteme für diese Verbindungen sehr gut charakterisiert, in Archaea wurde aber bislang nur ein Transporter für Glycin Betain auf molekularer Ebene identifiziert und näher untersucht.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die biochemische und physiologische Analyse eines putativen Transporters (ProU) aus dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, der auf Proteinebene signifikante Sequenzidentitäten zu bereits charakterisierten Aufnahmesystemen für kompatible Solute aufweist und zur Familie der ABC-Transporter zählt. Zur näheren Analyse der Substratspezifität und der kinetischen Parameter des extrazellulären Substratbindepoteins ProX, gelang es im Rahmen dieser Arbeit, das Protein funktionell in *Escherichia coli* überzuproduzieren und zu reinigen. ProX hat Glycin Betain und Prolin Betain als Substrat und weist für beide Verbindungen Affinitätskonstanten im unteren nanomolaren Bereich auf. Darüber hinaus zeigt es ein interessantes Temperaturverhalten, da es bereits bei 25°C seine Substrate bindet und selbst bei 100°C nicht thermisch inaktiviert wird. Um Aufschluss über die Struktur des Proteins und die Art der Substratbindung zu erhalten, wurden Kristallisationsexperimente mit dem heterolog exprimierten ProX durchgeführt. Die Struktur von ProX wurde von André Schiefner (AG Welte, Universität Konstanz) gelöst.

Die Eigenschaften des Bindeproteins lassen darauf schließen, dass *A. fulgidus* mit dem ProU-Transporter ein hochaffines Aufnahmesystem für kompatible Solute zur Verfügung steht und damit konnte ProU als erster ABC-Transporter für diese Verbindungen in einem hyperthermophilen Archaeon identifiziert werden. Eine Analyse hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von Glycin Betain in *A. fulgidus* führte zu dem unerwarteten Ergebnis, dass Glycin Betain diesem Organismus nicht zu osmoprotektiven Zwecken dient, sondern Glycin Betain die Hitzetoleranz von *A. fulgidus* steigert. Westernblot Analysen mit einem ProX spezifischen Antikörper zeigten, dass die Menge von ProX in *A. fulgidus* Zellextrakten abhängig von Hitzestress, aber nicht osmotisch reguliert wird. Obwohl es nicht möglich ist, in *A. fulgidus* Deletionsmutanten zu generieren, lässt sich die Glycin Betain Aufnahme unter diesen Bedingungen vermutlich allein auf ProU zurückführen, da dem Organismus basierend auf Datenbankanalysen keine weiteren Aufnahmesysteme für diese Verbindung zur Verfügung stehen.

Um nähere Einblicke in die Rolle kompatibler Solute als Thermoprotektiva zu erhalten, wurde die Nutzung kompatibler Solute in dem mesophilen Bodenbakterium *Bacillus subtilis* zur Thermoprotektion näher untersucht. Die meisten kompatiblen Solute, die von *B. subtilis* als Osmoprotektiva genutzt werden, wirken in diesem Organismus auch thermoprotektiv. Eine nähere Analyse der involvierten Aufnahmesysteme zeigte, dass *B. subtilis* für die Aufnahme kompatibler Solute bei Hitzestress dieselben Transporter nutzt wie unter osmotischem Stress. Mittels Northernblot-Analysen konnte eine durch Hitzestress induzierte Transkription der für die involvierten Transporter codierenden Gene nachgewiesen werden. Ein Vergleich des Glycin Betain-Pools ungestresster *B. subtilis*-Zellen und *B. subtilis*-Kulturen, die bei 52°C kultiviert wurden lieferte Erkenntnisse darüber, welche Konzentrationen kompatibler Solute unter Hitzestress intrazellulär akkumuliert werden. In *B. subtilis* ist der Glycin Betain-Pool sowohl bei 37°C als auch bei 52°C nahezu identisch. Kompatible Solute müssen demnach bei supraoptimalen Temperaturen nicht, wie bei osmotischem Stress, bis zu molaren Konzentrationen angehäuft werden, sondern es reichen offenbar deutlich geringere Mengen aus, um eine effektive Thermoprotektion zu gewährleisten. Einige Organismen synthetisieren unter Hitzestress dieselben kompatiblen Solute *de novo* wie unter hyperosmotischen Bedingungen. Da *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen Prolin mittels *de novo* Synthese akkumuliert, wurde der osmotisch kontrollierte Prolinsyntheseweg (ProHJ) in *B. subtilis* im Zusammenhang mit Hitzestress näher beleuchtet. In Northernblot Analysen zeigte sich, dass die Gene für die Enzyme der osmotisch kontrollierten Synthese von Prolin auch unter Hitzestress deutlich induziert sind und Primerextension Analysen zeigten, dass die Transkription unter diesen Bedingungen unter der Kontrolle desselben  $\sigma^A$ -abhängigen Promotors erfolgte wie bei hoher Salinität. Eine ProHJ-Mutante wies aber bei 52°C keinerlei Wachstumsnachteil im Vergleich zum Wildtyp auf und HPLC-Analysen von *B. subtilis* Zellextrakten belegten eine fehlende Prolin-Akkumulation bei 52°C. *B. subtilis* nutzt bei Hitzestress also exogen vorhandene kompatible Solute und akkumuliert diese durch die bereits aus der Osmostressantwort bekannten Opu-Transporter. Eine Anhäufung kompatibler Solute durch *de novo* Synthese findet bei 52°C jedoch nicht statt. Neben der allgemein bekannten Synthese sogenannter Hitzeschockproteine als Antwort auf Hitzestress kommt offenbar auch der Akkumulation kompatibler Solute aus der Umwelt als Anpassungsstrategie an supraoptimale Temperaturen eine fundamentale Bedeutung zu.

## I. SUMMARY

Compatible solutes were discovered for the first time in connection with the osmotic stress response of different organisms and called osmoprotectants since that time. However, recently it became evident that compatible solutes protect organisms also against other harsh growth conditions (cold, heat, desiccation) and compatible solutes play thus a more general role as stress protectants. In the domain of Bacteria uptake systems for these compounds are well characterized, whereas in Archaea there is only one transporter for glycine betaine identified on molecular level.

Topic of the present work was the biochemical and physiological analysis of a putative transporter (ProU) from the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, which shows significant sequence-identity to already characterized uptake systems for compatible solutes and belongs to the family of ABC-transporters. To investigate the substrate specificity and the kinetic parameters of the extracellular substrate binding protein ProX it was possible to express the protein heterologously in *Escherichia coli* and to purify it to homogeneity. Substrates of ProX are glycine betaine and proline betaine and the protein displays an affinity in the low nanomolar range for both compounds. Above this it shows an interesting temperature dependence, since it binds its substrates already at 25°C and is not inactivated by incubation at 100°C. To get an insight into the structure and the mode of substrate binding, crystallization experiments were performed with the heterologously expressed ProX. The structure of ProX was solved by André Schiefner (AG Welte, university of Konstanz).

The properties of the binding protein imply that ProU serves as a high-affinity uptake system for compatible solutes in *A. fulgidus* and thus ProU was the first uptake system for compatible solutes characterized in a hyperthermophilic Archaeon. Investigations concerning the physiological role of glycine betaine in *A. fulgidus* lead to the unexpected result that glycine betaine does not serve for osmoprotective purposes in this organism but increases the heat tolerance of *A. fulgidus*. Western blot analyses with a ProX specific antibody revealed, that the amount of ProX depends on heat stress but is not influenced by osmolarity. Although it is not possible to generate deletion mutants in *A. fulgidus*, the uptake of glycine betaine goes presumably solely back to the ProU system, because database analyses revealed that the organism does not possess any additional uptake systems for the uptake of these compounds.

To get a closer look on the role of compatible solutes as thermoprotectants, the role of compatible solutes as heat protectants was analyzed in the mesophilic soil bacterium *Bacillus subtilis*. Most compatible solutes which are used by *B. subtilis* as osmoprotectants also mediate heat protection. An analysis of the involved uptake system showed that *B. subtilis* recruits the same uptake systems under heat stress as under osmotic stress. By means of northern blot analyses it could be shown that the transcription of the genes of the involved transporters is increased upon heat stress. A comparison of the glycine betaine pool of unstressed *B. subtilis* cells with *B. subtilis* grown at 52°C revealed to what extent glycine betaine is accumulated in response to heat stress. The glycine betaine pool of *B. subtilis* is identical at 37°C as well as at 52°C. Thus compatible solutes are not necessarily accumulated to molar concentrations under supraoptimal temperatures – as under osmotic stress – but lower amounts are apparently sufficient to mediate effective thermoprotection. Some organisms synthesize upon heat stress the same compatible solutes de novo like in response to hyperosmotic growth conditions. Since *B. subtilis* accumulates proline under hyperosmotic conditions, the osmotically controlled proline biosynthetic pathway (ProHJ) was analyzed in connection with heat stress. Northern blot analyses revealed that the genes for the enzymes of the osmotically controlled synthesis of proline are also significantly induced under heat stress and primer-extension analyses showed that transcription is mediated by the same  $\sigma^A$ -dependent promoter as upon high salinity. A ProHJ mutant strain however did not show a growth defect at 52°C in comparison with the wild type and HPLC-analyses of cell extracts verified a missing proline accumulation at 52°C. *B. subtilis* uses exogenous compatible solutes under heat stress and accumulates these through the Opu-transporters, but an accumulation of compatible solutes through de novo synthesis is absent at 52°C. Besides the well known synthesis of so-called heat-shock proteins as response to heat stress, the accumulation of compatible solutes plays a fundamental role as adaptation strategy to supraoptimal growth temperatures.

## II. EINLEITUNG

### 1. Anpassung von Mikroorganismen an variierende Umweltbedingungen

#### 1.1 Anpassung an hohe Osmolarität

In den natürlichen Habitaten von Mikroorganismen können durch Nährstofflimitation, Austrocknung, Schwankungen in Temperatur und pH-Wert innerhalb kurzer Zeit drastisch veränderte Lebensbedingungen entstehen. Trotzdem sind Mikroorganismen in der Lage, auch solche Lebensräume erfolgreich zu besiedeln, die sich durch deutliche Schwankungen biotischer und abiotischer Faktoren auszeichnen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Osmolarität zu. Einige Mikroorganismen sind in ihrem Habitat – dem Meerwasser oder Salzseen – der permanenten Präsenz hoher Konzentrationen osmotisch wirksamer Bestandteile ausgesetzt (Ventosa *et al.*, 1998), während andere den Boden oder die oberen Bodenschichten besiedeln und damit durch Austrocknung und Überflutung verursachte drastische Veränderungen der Wasseraktivität ausgleichen müssen (Galinski & Trüper, 1994; Miller & Wood, 1996; Ventosa *et al.*, 1998).

Die bakterielle Zellmembran ist für Wasser, Glycerin und kurzkettige Alkohole durchlässig, bildet jedoch eine effektive Barriere für anorganische Salze, Makromoleküle und organische Verbindungen im Zytoplasma oder der Umgebung der Zelle (Bovell *et al.*, 1963). Normalerweise ist die intrazelluläre Konzentration osmotisch aktiver Substanzen höher als die des umgebenden Mediums. Das hat die Konsequenz, dass Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zellen einströmt und sich damit ein hydrostatischer Druck, der sogenannte Turgor, gegen die Zellwand gerichtet aufbaut. Die Aufrechterhaltung des Turgors innerhalb enger Grenzen wird als notwendig für das Zellwachstum und die Zellteilung angesehen (Höltje, 1998; Koch, 1983).

Sinkt die externe Wasseraktivität, kommt es zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle. Damit besteht die Gefahr der Plasmolyse und eines Zusammenbruchs des Turgors, was letztendlich zum Wachstumsstillstand führt. Wird die Zelle dagegen hypoosmolaren Bedingungen ausgesetzt, strömt Wasser in die Zellen ein und im Extremfall besteht die Gefahr des Platzens. Strategien zur Anpassung an Schwankungen der externen Osmolarität sind also von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und Wachstumsvermögen von Mikroorganismen. Da Mikroorganismen keine Systeme für den aktiven Wassertransport

besitzen, sind sie darauf angewiesen den Wasserstrom über die Membran durch den Gehalt an intrazellulären osmotisch aktiven Substanzen zu regulieren. Mikroorganismen stehen dabei prinzipiell zwei Mechanismen zur Verfügung. In extrem halophilen Bacteria und Archaea dient die Anhäufung von anorganischen Salzen (hauptsächlich KCl) dazu, die hohe Osmolarität des Mediums auszugleichen (Galinski & Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998). Dabei werden diese Salze bis zu molaren Konzentrationen angehäuft, was voraussetzt, dass die gesamten metabolischen und regulatorischen Prozesse dieser Organismen an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen angepasst sind. So sind einige biochemische Prozesse strikt von der hohen intrazellulären Kaliumkonzentration abhängig und die Zellmembran vieler halophiler Mikroorganismen ist unterhalb der hohen Ionenstärke strukturell nicht stabil (Brown, 1963; Dennis & Shimmin, 1997; Eisenberg & Wachtel, 1987; Zhilana & Zavarzin, 1990). Diese Anpassungsstrategie ist sehr erfolgreich bei der Adaptation an extreme Salzkonzentrationen, erweist sich aber als relativ unflexibel und beschränkt die Habitate solcher extrem halophilen Mikroorganismen auf Salzseen und Salinen.

Die meisten Bacteria und Archaea, die moderater Osmolarität ausgesetzt bzw. regelmäßig Fluktuationen der externen Osmolarität unterworfen sind, bedienen sich einer anderen Strategie, die sie in Hinblick auf die Wahl ihrer Habitate deutlich flexibler macht als halophile Mikroorganismen. Als initiale Antwort auf hyperosmotischen Stress wird ebenfalls  $K^+$  angehäuft, das aber in derartig hoher Konzentration aufgrund der Inkompatibilität mit dem Zellmetabolismus nach kurzer Zeit in einem zweiten Schritt der Anpassung durch niedermolekulare organische Solute ersetzt wird (Bremer & Krämer, 2000; Csonka & Epstein, 1996; Kempf & Bremer, 1998b). Diese organischen Solute werden bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert, ohne den Zellmetabolismus zu beeinträchtigen. Daher werden sie auch als kompatible Solute bezeichnet (Brown, 1976). Neben ihrer osmotischen Aktivität und dem daraus resultierenden Beitrag zur Aufrechterhaltung des Turgors, sind diese Verbindungen in der Lage, die Struktur und Stabilität von Proteinen unter hochosmolaren Bedingungen positiv zu beeinflussen (Brown, 1976; Galinski & Trüper, 1994; Pollard & Wyn Jones, 1981).

## 1.2 Kompatible Solute: Natur und Funktionsweise

Obwohl die Fähigkeit zur Akkumulation kompatibler Solute als Antwort auf hyperosmotischen Stress in Eukarya, Bacteria und Archaea verbreitet ist (Bohnert, 1995;



Kempf & Bremer, 1998b; Roberts, 2000), rekrutiert sich das Spektrum der verwendeten kompatiblen Solute aus lediglich vier Hauptgruppen: (i) Zucker, Heteroside und Polyole (z.B. Trehalose oder Glycerin), (ii)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aminosäuren (z.B. Prolin oder Glutamat) und ihre Derivate (z. B. Ectoin), (iii) Trimethylammoniumverbindungen (z.B. Glycin Betain, Cholin oder Carnitin) und (iv) Methylsulfonium-Verbindungen und Sulfatester (z.B. Dimethylsulfoniumpropionat oder Cholin-O-sulfat). Die meisten kompatiblen Solute in Bacteria und Eukarya sind metabolisch inert, polar (bei physiologischem pH-Wert ungeladen oder zwitterionisch) und bis zu molaren Konzentrationen löslich (Csonka, 1989). Die von Archaea bevorzugten kompatiblen Solute gleichen in ihrer Grundstruktur und ihren Eigenschaften den von Bacteria und Eukarya verwendeten, allerdings mit dem Unterschied, dass der Grossteil von ihnen eine negative Ladung trägt (Martins *et al.*, 1997; Roberts, 2000; Roessler & Muller, 2001). Dieser anionische Charakter beruht in den meisten Fällen auf einer Carboxylat-, Phosphat- oder Sulfatgruppe. Eine denkbare Erklärung für die Verwendung negativ geladener Solute ist, dass sie den Archaea als Gegenion zur hohen intrazellulären  $K^+$ -Konzentration dienen (Martin *et al.*, 1999; Roberts, 2000).

Im Laufe der letzten Jahre stellte sich heraus, dass kompatible Solute von Zellen nicht allein zu osmoprotektiven Zwecken akkumuliert werden, sondern auch die Toleranz gegenüber anderen Stressarten erhöhen. Schon seit längerer Zeit ist der positive Einfluss Zuckern und Polyolen auf die Toleranz von Mikroorganismen gegen Einfrieren und Auftauen bekannt (Hino *et al.*, 1990; Mazur, 1968) und so werden kompatible Solute routinemäßig als Additiva für mikrobiologische Proben verwendet, die gefroren oder lyophilisiert werden sollen (Barbour & Priest, 1986; Simione & Brown, 1991). Zudem konnte in Bakterien und Pilzen eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt kompatibler Solute und ihrer Resistenz gegenüber Austrocknung nachgewiesen werden (Gadd *et al.*, 1987; Potts, 1994). Ein weiteres Beispiel für die weitreichenden protektiven Eigenschaften kompatibler Solute ist, dass Hefe-Zellen, die ausgelöst durch Stress Trehalose akkumuliert haben, deutlich resistenter gegen Sauerstoffradikale sind, als solche mit einem niedrigen Trehalose-Level (Benaroudj *et al.*, 2001). Besonders hervorzuheben sind jedoch die fördernden Eigenschaften kompatibler Solute auf das Wachstum von Mikroorganismen bei Kältestress sowie bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen. So konnte von Ko *et al.* (1994) gezeigt werden, dass Glycin Betain in *Listeria monocytogenes* bei Wachstum in der Kälte verstärkt transportiert wird und kryoprotektiv wirkt. Etwas später wurden auch andere Solute auf diese Eigenschaft hin untersucht und es stellte sich heraus, dass auch Strukturanaloga von Glycin Betain und Dimethylsulfoniumverbindungen das Wachstum von *L. monocytogenes* bei Kältestress

fördern (Bayles & Wilkinson, 2000). Diese kryoprotektive Wirkung kompatibler Solute konnte auch in *B. subtilis* nachgewiesen werden und es ist mittlerweile bekannt, dass für die Aufnahme der Solute unter Kältestress ebenfalls die bei osmotischem Stress genutzten Transporter dienen. (Spaller, 1999), (T. Hoffmann, Universität Marburg pers. Mitteilung). Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in Mikroorganismen führten zu dem Ergebnis, dass z.B. das Disaccharid Trehalose das Wachstum von Hefe und Enterobakterien wie *Salmonella* und *Escherichia coli* bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen fördert (Canovas *et al.*, 2001; Hengge-Aronis *et al.*, 1991; Hottinger *et al.*, 1987; Hottinger *et al.*, 1989). Zudem konnte gezeigt werden dass Glycin Betain sowohl in *E. coli* (Caldas *et al.*, 1999) als auch in Pflanzen (Alia *et al.*, 1998) die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen erhöht. Stress, der durch supraoptimale Wachstumstemperaturen zustande kommt, tritt in der Natur häufig in Kombination mit osmotischem Stress auf (z.B. bedingt durch Austrocknung). Untersuchungen zur Auswirkungen dieser Kombination zweier Stressfaktoren kamen zu dem Ergebnis, dass hyperosmotische Wachstumsbedingungen die Thermotoleranz von Mikroorganismen erhöhen können (Canovas *et al.*, 2001; Fletcher & Csonka, 1998; Fletcher *et al.*, 2001). Die unter hyperosmotischen Bedingungen gesteigerte Toleranz gegenüber Hitze wird dabei auf die osmotisch induzierte Akkumulation kompatibler Solute zurückgeführt. Dabei ist es nicht relevant, ob die kompatiblen Solute durch Aufnahme aus der Umwelt oder durch endogene *de novo* Synthese angehäuft werden (Canovas *et al.*, 2001).

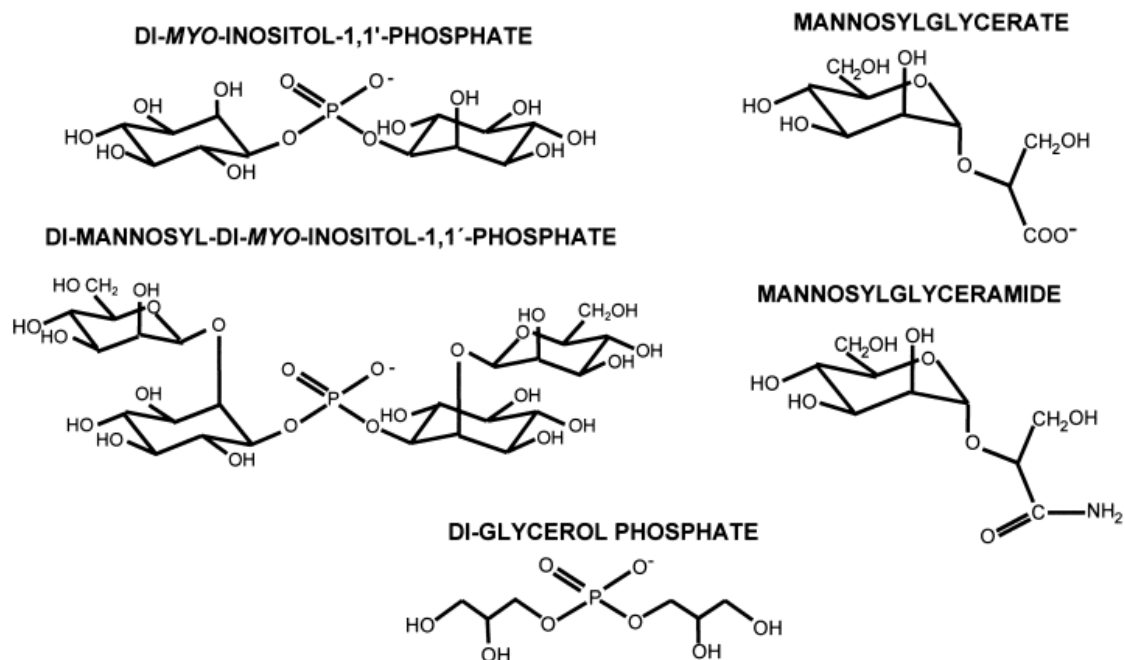
Die thermoprotektive Wirkung verschiedener kompatibler Solute ließ sich auch *in vitro* durch Untersuchungen zur stabilisierenden Wirkung dieser Verbindungen auf Proteine bestätigen. In diesen Studien wurde sowohl der Effekt verbreiteter Solute wie Glycin Betain, Hydroxyectoin oder Trehalose (Knapp *et al.*, 1999; Singer & Lindquist, 1998), als auch der Effekt kompatibler Solute, die fast ausschließlich in hyperthermophilen Archaea (z.B. Mannosylglycerat, 2,3-Bisphosphoglycerat oder Diphosphoglycerat (Borges *et al.*, 2002; Lamosa *et al.*, 2000; Shima *et al.*, 1998)) vorkommen, untersucht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendeten Solute die getesteten Enzyme gegen thermische Inaktivierung schützten und die Temperatur, bei der die Proteine aggregierten, deutlich erhöhten. Die Effizienz dieser protektiven Wirkung war dabei sowohl von der Konzentration als auch von dem jeweils eingesetzten Solut abhängig. Diese Entdeckung macht kompatible Solute auch für die angewandte Forschung interessant, da der Einsatz dieser Verbindungen die Stabilität von Proteinen deutlich steigern und damit unter Umständen zur einer höheren Produktivität biotechnologischer Prozesse beitragen kann (Borges *et al.*, 2002).

Die enorme Vielfalt der protektiven Wirkungen kompatibler Solute wirft die Frage nach der Wirkungsweise dieser Substanzen auf. Nach einem Modell von Arakawa & Timasheff (1985) werden diese Verbindungen aus der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen und wirken durch diese „preferential-exclusion“ stabilisierend auf die Hydrathülle von Proteinen und anderen Makromolekülen. Ihre nahezu fehlende Wechselwirkung mit den Proteinen an sich erklärt ihre Kompatibilität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Arakawa & Timasheff, 1985). Die präferentielle Exklusion kompatibler Solute aus der Hydrathülle von Proteinen führt, aufgrund der nicht-homogenen Verteilung der Solute innerhalb der Zelle (Erniedrigung der Entropie) zu einem thermodynamischen Ungleichgewicht. Das Ausmaß dieses Ungleichgewichts ist zumindest zu einem Teil abhängig von dem Volumen des Wassers, von dem das Solut ausgeschlossen wird, und damit wird dieses Ungleichgewicht reduziert, wenn das Protein ein möglichst kleines Volumen einnimmt. Das wiederum steht einer Oberflächenvergrößerung des Proteins entgegen und stabilisiert damit die native Faltung von Proteinen (Arakawa & Timasheff, 1985; Bolen & Baskakov, 2001; Timasheff, 1998; Winzor *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Eigenschaft werden kompatible Solute auch als chemische Chaperone bezeichnet (Tatzelt *et al.*, 1996).

### 1.3 Kompatible Solute in hyperthermophilen Archaea

Die meisten mesophilen Organismen nutzen nahezu dasselbe Spektrum von Verbindungen als kompatible Solute, wobei Glycin Betain das wohl am häufigsten genutzte Solut darstellt. In (hyper)thermophilen Mikroorganismen finden sich dagegen kompatible Solute, deren Vorkommen nahezu ausschließlich auf diese Gruppe beschränkt ist (Santos & Da Costa, 2002). Dieser Befund verleitet zu der Annahme, dass diese speziellen Verbindungen mit dem Leben bei extremen Temperaturen in Zusammenhang stehen. Da ein Großteil dieser Verbindungen erst in den letzten Jahren identifiziert wurde, soll eine Auswahl an dieser Stelle kurz vorgestellt werden. Eine Gemeinsamkeit dieser Solute ist ihre negative Ladung und in diesem Aspekt gleichen sie den kompatiblen Soluten, die auch von mesophilen Archaea genutzt werden (Martin *et al.*, 1999). Das am weitesten verbreitete Solut in hyperthermophilen Mikroorganismen ist Di-myo-inositol-1,1'-phosphat (DIP), das ursprünglich in *Pyrococcus woesei* (Scholz *et al.*, 1992) und *Methanococcus igneus* (Ciulla *et al.*, 1994) identifiziert wurde. Die strikte Definition dieses kompatiblen Solut als Osmoprotektivum ist hier nicht zutreffend, da es von den meisten Organismen vor allem bei

supraoptimalen Wachstumstemperaturen akkumuliert wird (Martins & Santos, 1995). Die myo-Inositol Derivate Di-myo-inositol-1,3'-phosphat und Di-mannosyl-di-myo-inositolphosphat werden von den hyperthermophilen Bakterien *Thermotoga neapolitana* und *Thermotoga maritima* akkumuliert und erhöhen deutlich deren maximale Wachstumstemperatur, während DIP in diesen Organismen das Hauptsolut bei osmotischem Stress darstellt (Martins *et al.*, 1996). Zwei andere weit verbreitete Solute sind das  $\alpha$ -Mannosylglycerat und das entsprechende Amid ( $\alpha$ -Mannosylglyceramid), die in dem thermophilen Bakterium *Rhodothermus marinus* (Nunes *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1999) und in Archaea der Gattungen *Archaeoglobus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Aeropyrum* und *Methanothermus* vorkommen. Die intrazelluläre Konzentration von Mannosylglycerat verhält sich proportional zur Osmolarität des Mediums und es scheint daher als Osmoprotektivum zu fungieren. Ein anderes Solut, das ausschließlich in methanogenen Archaea vorkommt, ist zyklisches 2,3-Bisphosphoglycerat. Es tritt sowohl in mesophilen als auch in (hyper)thermophilen Methanogenen auf (Martins *et al.*, 1997; Santos & da Costa, 2001) und die Akkumulation dieser Verbindung ist mit hoher Wachstumstemperatur korreliert. Diglycerolphosphat (DGP) ist ein Solut, das bisher nur in *Archaeoglobus fulgidus* identifiziert wurde und hier das dominante Solut bei Salzstress darstellt (Martins *et al.*, 1997).



**Abb. 1: Kompatible Solute aus (hyper)thermophilen Bacteria und Archaea**

(Quelle: Santos & da Costa, 2002)

Die Tatsache, dass vielen der hier vorgestellten Solute in hyperthermophilen Mikroorganismen neben ihrer Rolle als Osmoprotektivum auch eine Bedeutung bei der Anpassung an supraoptimale Wachstumsbedingungen zukommt, verdeutlicht ihre Aufgabe als vielschichtige Stressprotektiva.

## 1.4 Akkumulation kompatibler Solute in *B. subtilis*

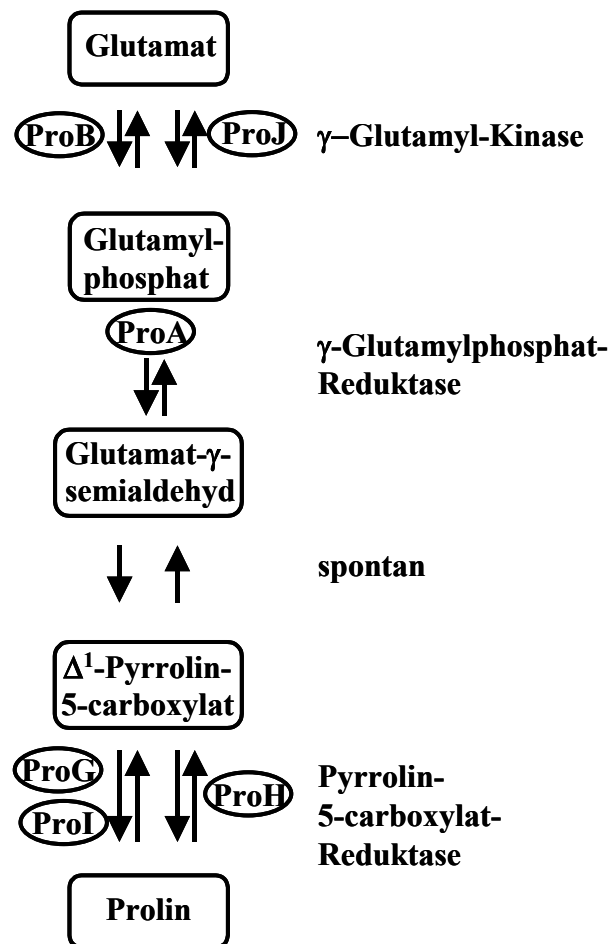
Generell stehen Organismen zwei Möglichkeiten zur Akkumulation kompatibler Solute zur Verfügung: *de novo* Synthese oder Aufnahme aus der Umwelt. In dem Gram-positiven, komplett sequenzierten Modellorganismus *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) wurden die Mechanismen zur Akkumulation kompatibler Solute im Zusammenhang mit der Osmostressantwort aufgeklärt (Kempf & Bremer, 1998a).

### 1.4.1 Synthese des kompatiblen Solutes Prolin

Die initiale Antwort von *B. subtilis* auf hyperosmotischen Stress ist die intrazelluläre Akkumulation grosser Mengen  $K^+$  (Whatmore *et al.*, 1990; Whatmore & Reed, 1990). Die Aufnahme dieses Ions verläuft dabei über zwei unterschiedlich affine Transportsysteme (KtrAB und KtrCD) (Holtmann *et al.*, im Druck), die aus jeweils einer Transmembrankomponente und einer peripheren Membrankomponente mit putativer Nukleotidbindestelle (für  $NAD^+$  bzw.  $NADH$ ) bestehen (Nakamura *et al.*, 1998). Es ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkung dieser Dinukleotide mit der cytoplasmatischen Untereinheit die Aktivität der Translokator-domäne durch einen Liganden-vermittelten „switch“-Mechanismus regulieren (Roosild *et al.*, 2002).

Aufgrund der negativen Effekte, die Kalium in hoher Konzentration auf den Zellmetabolismus ausübt, ersetzt *B. subtilis* das anfangs angehäuften Kalium in einem zweiten Schritt der Anpassung durch kompatible Solute und sorgt so für eine langfristige Wiederherstellung des Turgors. Stehen *B. subtilis* exogen keine kompatiblen Solute zur Verfügung, initiiert der Organismus die massive *de novo* Synthese von Prolin (Whatmore *et al.*, 1990). Whatmore *et al.* (1990) konnten zeigen, dass der intrazelluläre Prolin-Pool nach einem moderaten „upshock“ mit 0,4 M NaCl von einem basalen Level von 16 mM auf 700 mM ansteigt. Da Prolin von *B. subtilis* zudem auch für anabole Zwecke benötigt wird, stellt sich die Frage, wie die Synthese dieses Solutes koordiniert wird, um den unterschiedlichen

Anforderungen gerecht zu werden. Die Synthese von Prolin erfolgt in zahlreichen Mikroorganismen ausgehend von Glutamat in drei enzymatischen Reaktionen. Im ersten Schritt wird Glutamat mit Hilfe einer  $\gamma$ -Glutamyl-Kinase (ProB) zu  $\gamma$ -Glutamylphosphat phosphoryliert. Diese Verbindung wird dann zu Glutamat- $\gamma$ -Semialdehyd reduziert. Als Enzym kommt dabei eine  $\gamma$ -Glutamylphosphat-Reduktase (ProA) zum Einsatz. Das entstandene Semialdehyd zyklisiert anschließend unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  spontan zu  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat und wird dann im letzten Schritt von einer Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (ProC) zu Prolin reduziert (Leisinger, 1996; Vogel & Davis, 1952). In den meisten Organismen unterliegt die Prolinsynthese einer Endprodukthemmung. Dabei führt z.B. in *E. coli* das Vorliegen von Prolin im mikromolaren Bereich bereits zu einer 50 %-igen Inhibition der  $\gamma$ -Glutamyl-Kinase (Smith *et al.*, 1984).



**Abb. 2: Syntheseweg für Prolin in *B. subtilis***

Dargestellt ist auf der linken Seite der Prolinbiosyntheseweg für anabole Zwecke und auf der rechten Seite der Prolinbiosyntheseweg für die Akkumulation von Prolin unter osmotischem Stress.

Um diese Endprodukthemmung zur Akkumulation von Prolin unter osmotischem Stress zu umgehen, liegt in *B. subtilis* neben dem Prolinbiosyntheseweg für anabole Zwecke ein zweiter osmotisch induzierbarer Prolinbiosyntheseweg vor (Brill & Bremer, 2002) (Abb. 2). ProJ (Isoenzym der  $\gamma$ -Glutamyl-Kinase) und ProH (Isoenzym der Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase) ersetzen in diesem Syntheseweg unter hyperosmolaren Bedingungen die für anabole Zwecke fungierenden Enzyme ProB und ProI/ProG. Beide Biosynthesewege nutzen die  $\gamma$ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA (Abb.2). Die Expression der Gene der zwei Prolinsynthese-Wege wird ihren Aufgaben entsprechend reguliert. So steht das *proHJ*-Operon unter osmotischer Kontrolle, während die Transkriptionseinheiten *proI* und *proBA* über einen Antiterminationsmechanismus reguliert werden, der die Transkription dieser Gene dem Prolinbedarf der Zelle anpasst (Brill, 2001).

#### 1.4.2 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt

In das natürliche Habitat von *B. subtilis* wird eine Vielzahl kompatibler Solute durch verrottendes Pflanzenmaterial, Wurzelexsudate oder osmotisch gestresste Mikroorganismen eingetragen. Die Aufnahme dieser Solute bietet *B. subtilis* damit eine Alternative zur *de novo* Synthese von Prolin.

Auch exogen verfügbares Prolin fungiert in *B. subtilis* als Osmoprotektivum. Im Gegensatz zu *E. coli*, dem mit dem sekundären Transporter ProP und dem ABC-Transporter ProU zwei Aufnahmesysteme zur osmotisch stimulierten Aufnahme von Prolin zur Verfügung stehen (Csonka & Epstein, 1996), nutzt *B. subtilis* nur einen sekundären Transporter, OpuE (Osmoprotectant uptake), für die Aufnahme von Prolin als kompatibles Solut (von Blohn *et al.*, 1997). Der OpuE-Transporter besteht aus einer Komponente und gehört zur Familie der „Sodium/Solut-Transporter“, die Proteine aus Prokaryoten und Eukaryoten umfasst, welche die Aufnahme ihrer entsprechenden Substrate mit der Aufnahme von  $\text{Na}^+$  koppeln. Die Prolin-Aufnahme wird in Abhängigkeit von der externen Osmolarität reguliert. Eine Steigerung der externen Osmolarität durch ionische oder nicht-ionische Osmolyte aktiviert dabei die Aufnahme der Aminosäure und nähere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Aktivierung der Prolin-Aufnahme allein auf dieser *de novo* Proteinsynthese basiert und damit ausschließlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (von Blohn *et al.*, 1997). Die Expression von *opuE* steht unter der Kontrolle zweier direkt benachbarter Promotoren, die von verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren erkannt werden. Dabei ist *opuE* P-1 von dem vegetativen  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^A$  abhängig, während *opuE* P-2 von dem Stress-induzierten  $\sigma^B$  erkannt wird

(Spiegelhalter & Bremer, 1998; von Blohn *et al.*, 1997). Die Transkription von dem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor aus wird durch eine plötzliche Erhöhung der Osmolarität stimuliert und bedingt eine transiente Aktivierung der Transkription. Ist *B. subtilis* über einen langen Zeitraum erhöhter Osmolarität ausgesetzt, erfolgt die Transkription ausschließlich vom  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor aus und bleibt so lange auf einem erhöhten Level, wie der osmotische Stress andauert. Die Unterschiede im Transkriptionsmuster der beiden verschiedenen Promotoren legen nahe, dass in *B. subtilis* wenigstens zwei Signaltransduktionskaskaden zur Weiterleitung des Stimulus osmotischer Stress an den Transkriptionsapparat der Zelle vorliegen (Spiegelhalter & Bremer, 1998).

Trimethylammoniumverbindungen sind in den Habitaten von Mikroorganismen ebenfalls weit verbreitet und werden von einer Reihe Organismen als kompatible Solute genutzt. Dabei ist Glycin Betain die wohl am häufigsten genutzte Verbindung. Physikochemische Analysen haben vor kurzer Zeit ergeben, dass es unter osmotischem Stress das wahrscheinlich effektivste kompatible Solut darstellt (Courtenay *et al.*, 2000). Zur Aufnahme von Glycin Betain und strukturverwandten Verbindungen rekrutiert *B. subtilis* drei Transportsysteme: OpuA, OpuC und OpuD (Kappes *et al.*, 1996; Kempf & Bremer, 1995). Eine nähere Charakterisierung der unterschiedlichen Transporter zeigte, dass OpuA und OpuC zur Familie der ABC-Transporter gehören, während OpuD aus einer Komponente besteht und zur BCCT-Familie (Betain-, Carnitin, Cholin-Transporter) zählt (Paulsen *et al.*, 1998).

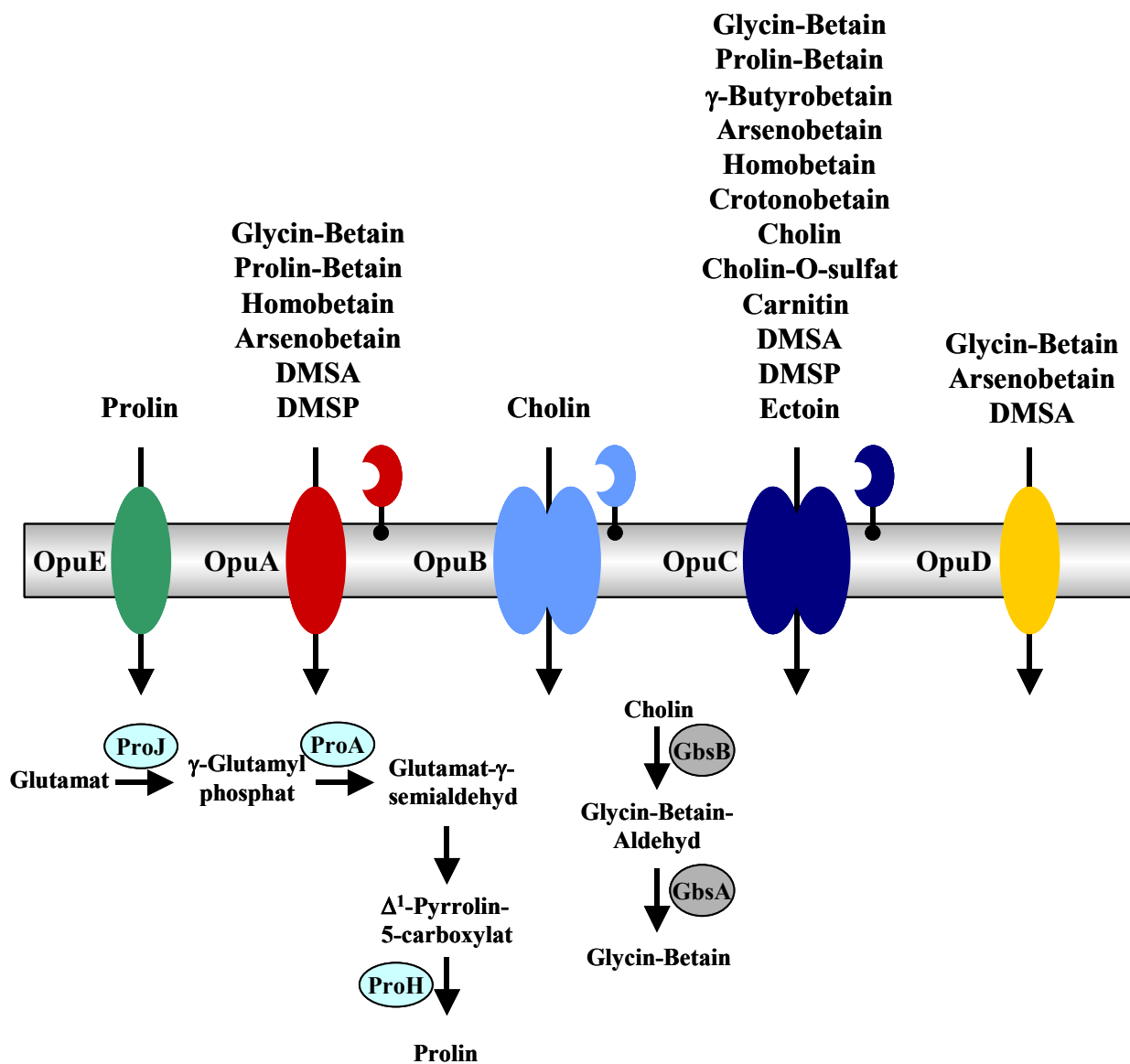
Die zwei ABC-Transporter OpuA und OpuC sind mit dem Bindeprotein-abhängigen Glycin-Betain Transporter ProU aus *E. coli* und *S. typhimurium* verwandt (Csonka & Epstein, 1996; Gowrishankar & Manna, 1996; Lucht & Bremer, 1994). OpuA besteht aus dem Bindeprotein OpuAC, der Transmembrankomponenten OpuAB und der ATPase OpuAA, während sich der OpuC Transporter durch das Vorhandensein einer zweiten Membrankomponente (OpuCD) von OpuA unterscheidet. Im Unterschied zu dem löslichen Bindeprotein ProX des ProU-Transporters sind seine beiden Pendants OpuAC und OpuCC über eine Lipidmodifikation an einem aminoterminalen Cysteinrest in der Membran von *B. subtilis* verankert, um einen Verlust des Bindeproteins in das umgebende Medium zu verhindern (Kappes *et al.*, 1999; Kempf *et al.*, 1997).

Vergleicht man die kinetischen Parameter der Opu-Transporter für die Aufnahme von Glycin-Betain, fällt auf, dass die  $K_m$ -Werte für Glycin-Betain bei allen drei Transportern im unteren mikromolaren Bereich liegen (Kappes *et al.*, 1996; Kempf & Bremer, 1995). Das ermöglicht *B. subtilis* eine effektive Aufnahme dieser Verbindung, selbst wenn sie nur in geringen



Mengen vorliegt. Die hohe Umsatzrate des OpuA-Transporters lässt darauf schließen, dass OpuA in *B. subtilis* den Haupttransporter für die Aufnahme von Glycin Betain darstellt.

Strukturanaloga von Glycin-Betain, wie Carnitin, Crotonobetain und  $\gamma$ -Butyrobetain, sind in der Natur ubiquitär verbreitet (Kleber, 1997) und werden ebenfalls als kompatible Solute genutzt. Eine Untersuchung der Opu-Transporter in Hinblick auf ihre Substratspezifität ergab, dass alle drei Glycin-Betain-Transporter Strukturanaloga von Glycin-Betain und auch Methyl-Sulfoniumverbindungen und Sulfatester transportieren (Abb. 3) (Jebbar *et al.*, 1992; Kappes & Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Nau-Wagner, 1999).



**Abb. 3: Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten in *B. subtilis***

Dargestellt sind OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE mit ihren jeweiligen Substratspezifitäten. Zudem sind der Prolin und Glycin Betain-Syntheseweg dargestellt.

OpuC weist dabei das breiteste Substratspektrum auf und kann auch das Tetrahydropyrimidin-Derivat Ectoin transportieren. Der  $K_m$ -Wert für dieses Substrat ist aber vergleichsweise hoch ( $K_m=1,6$  mM) (Jebbar *et al.*, 1992). Entsprechend ihrer Aufgabe bei der Osmoregulation von *B. subtilis* unterliegt die Aktivität aller drei Transporter osmotischer Kontrolle.

Zusätzlich zu den vier Opu-Transportern zur Aufnahme von Prolin, Glycin Betain und strukturverwandten Verbindungen steht *B. subtilis* noch ein weiterer Opu-Transporter (OpuB) zur Verfügung. Auf Proteinebene besteht zwischen OpuB und OpuC eine Sequenzidentität von circa 80 %, was darauf hindeutet, dass beide Transporter aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Kappes *et al.*, 1999). Trotz dieser signifikanten Sequenzidentität unterscheidet sich OpuB in Hinblick auf seine Substratspezifität deutlich von OpuC und dient ausschließlich der Aufnahme von Cholin. Cholin *per se* wirkt nicht osmoprotektiv, kann aber von *B. subtilis* zu Glycin Betain umgewandelt werden (Boch *et al.*, 1994). Cholin wird zu diesem Zweck aus der Umwelt über die ABC-Transporter OpuB und OpuC aufgenommen (Kappes *et al.*, 1999) und anschließend in zwei enzymatischen Schritten, die von der löslichen NAD-abhängigen TypIII Alkohol-Dehydrogenase GbsB (gbs: glycine betaine synthesis) und der salztoleranten Glycin Betain-Aldehyd-Dehydrogenase GbsA katalysiert werden, zu Glycin Betain oxidiert (Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997). Die genetische Information für diese Enzyme liegt in einem Operon, dessen Expression nicht durch die externe Osmolarität, sondern durch das Vorhandensein von Cholin im Medium aktiviert wird (Nau-Wagner, 1999). Diese Regulation ist abhängig von dem Transkriptionsregulator GbsR, der stromaufwärts des *gbsAB*-Operons in entgegengesetzter Orientierung codiert ist und auch die Expression von OpuB in Abhängigkeit der Cholinverfügbarkeit reguliert (Nau-Wagner, 1999).

## 1.5 Efflux von Soluten nach einem hypoosmotischen Schock

Die Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmolare Bedingungen ist mit der Akkumulation großer Mengen niedermolekularer Verbindungen gekoppelt. Werden bakterielle Zellen nach einer derartigen Anpassung plötzlich einem hypoosmotischen Schock ausgesetzt, kommt es entlang des Konzentrationsgradienten zu einem massiven Einstrom von Wasser in die Zellen. Als Konsequenz steigt der Turgor drastisch an, was die Zelle im Extremfall zum Platzen bringen kann. Um dem entgegenzuwirken, muss die Zelle in der Lage sein, osmotisch aktive Solute rasch aus dem Cytoplasma auszuschleusen. In vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ist der Efflux dieser Substanzen abhängig von

sogenannten dehnungsaktivierbaren mechanosensitiven Kanälen, durch welche die Osmolyte innerhalb weniger Sekunden nach einem hypoosmotischen Schock ausströmen können (Martinac, 2001). Untersuchungen in *E. coli* haben gezeigt, dass das Vorhandensein mechanosensitiver Kanäle essentiell für das Überleben eines osmotischen „Downshifts“ ist (Booth & Louis, 1999; Levina *et al.*, 1999). Die Öffnung dieser Kanäle ist abhängig von einer Konformationsänderung der Proteinstruktur, die durch Änderungen der Membranspannung bzw. Änderungen des Membranpotentials ausgelöst wird. Mittlerweile stehen die Kristallstrukturen der mechanosensitiven Kanäle MscL aus *Mycobacterium tuberculosis* und MscS aus *E. coli* zur Verfügung (Bass *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 1998), was weitere Schritte zur Aufklärung des Öffnungsprozesses ermöglicht.

Verwandte Proteine zu den in *E. coli* beschriebenen MscL- und MscS-Kanälen finden sich auch in *B. subtilis* und diese beiden Kanalproteine sind in diesem Organismus ebenfalls essentiell für ein Überleben eines hypoosmotischen Schocks (C. Boiangiu, Universität Marburg, pers. Mitteilung).

## 1.6 Aufnahmesysteme für kompatible Solute in anderen Bacteria und Archaea

Als Modellorganismus zur Erforschung Gram-negativer Organismen dient *E. coli* und daher ist dieser Organismus auch in Hinblick auf die Aufnahmesysteme für kompatible Solute am besten charakterisiert. Im Gegensatz zu *B. subtilis* rekrutiert *E. coli* lediglich zwei Transportsysteme zur Aufnahme von Glycin Betain und anderer kompatibler Solute: ProP und ProU (Csonka & Epstein, 1996). ProP ist ein Einkomponenten-Transportsystem, das kompatible Solute mit hoher Affinität im Symport mit Kationen in die Zelle transportiert. Ein Charakteristikum dieses Transporters ist seine carboxyterminale Extension, die, wie kürzlich von Culham *et al.* (2000) gezeigt werden konnte, eine zentrale Rolle bei der osmotischen Aktivierung des Transporters spielt. Hyperosmolare Bedingungen steigern sowohl die Transkription von *proP* als auch die Aktivität des ProP-Transporters (Gowrishankar, 1986). ProU gehört wie OpuA und OpuC aus *B. subtilis* zur Familie der ABC-Transporter und besteht aus dem extrazellulären Substratbindepotein ProX, der cytoplasmatischen ATPase ProV und der Transmembrankomponente ProW (Dattananda & Gowrishankar, 1989; Gowrishankar, 1989; Stirling *et al.*, 1989). Ähnlich wie OpuC aus *B. subtilis* weist ProU ein breites Substratspektrum für verschiedene kompatible Solute (z.B. Glycin Betain, Prolin Betain, Prolin, L-Carnitin,  $\gamma$ -Butyrobetain, DMSP) auf, wobei lediglich für Glycin Betain und

Prolin Betain eine Bindung durch das Substratbindeprotein ProX demonstriert werden konnte (Haardt *et al.*, 1995). Trotzdem ist die funktionelle Expression von ProX Voraussetzung für die Aufnahme der übrigen Solute (Haardt *et al.*, 1995). Welche Rolle ProX für die Aufnahme dieser nicht bindenden kompatiblen Solute spielt, ist bisher nicht geklärt. Die Aufnahme kompatibler Solute durch den ProU-Transporter wird sowohl durch Induktion der Gene (> 100-fach) als auch durch Stimulation des Transports bei hohen Osmolaritäten gesteigert (Gowrishankar & Manna, 1996).

Lange Zeit waren *B. subtilis* und *Clostridium glutamicum* die einzigen Gram-positiven Vertreter, für welche die Transportsysteme zur Aufnahme kompatibler Solute im Detail charakterisiert waren (Bremer & Krämer, 2000; Kempf & Bremer, 1998a). In den letzten Jahren wurden jedoch auch andere Gram positive Organismen in dieser Hinsicht näher untersucht. Besonders hervorzuheben sind dabei die Charakterisierungen von Transportsystemen für kompatible Solute aus dem humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* und dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis*.

Während *B. subtilis* zur Aufnahme kompatibler Solute sowohl ABC-Transporter als auch sekundäre Transporter zur Verfügung stehen, rekrutiert *C. glutamicum* für den Transport dieser Verbindungen ausschließlich sekundäre Transportsysteme (Peter *et al.*, 1998). Insgesamt stehen dem Organismus vier Transporter zur Aufnahme kompatibler Solute zur Verfügung: PutP, BetP, ProP und EctP. PutP unterliegt aber keiner osmotischen Kontrolle, sondern dient der Aufnahme von Prolin zu anabolen Zwecken (Peter *et al.*, 1997). ProP aus *C. glutamicum* ist hochgradig identisch zu ProP aus *E. coli* und dient der Aufnahme von Glycin Betain, Prolin und Ectoin. BetP ist spezifisch für Glycin Betain und zeigt signifikante Ähnlichkeit zu OpuD aus *B. subtilis*. Wie OpuD gehört BetP zur BCCT-Familie sekundärer Transporter. EctP zeigt wiederum eine weite Substratspezifität und transportiert alle kompatiblen Solute, die von *C. glutamicum* als Osmoprotektiva genutzt werden (Peter *et al.*, 1998). EctP gilt als eine Art Notfall-Aufnahmesystem und wird entsprechend konstitutiv exprimiert (Peter *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wird BetP auf transkriptioneller Ebene durch hohe Osmolarität induziert. Zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle werden ProP, BetP und EctP auf dem Level der Aktivität reguliert. Unterhalb einer externen Osmolalität von 0,5 osmol/kg sind die Transporter inaktiv, erreichen aber das Maximum ihrer Aktivität, wenn die Osmolalität auf 1,1-1,4 osmol/kg ansteigt (Peter *et al.*, 1998).

Physiologische Untersuchungen von *L. monocytogenes* deuteten auf einen spezifischen sekundären Transporter zur Aufnahme kompatibler Solute hin (Patchett *et al.*, 1994; Verheul

*et al.*, 1997). Die genetische Analyse dieses Organismus führte aber zur Identifizierung von drei unabhängigen Glycin Betain Aufnahmesystemen: BetL, OpuC und GbuABC. BetL zählt zu den sekundären Transportern und transportiert Glycin Betain mit hoher Affinität (Sleator *et al.*, 1999). Auf Proteinebene zeigt BetL deutliche Homologien zu OpuD aus *B. subtilis* und wird wie dieser Transporter sowohl auf transkriptioneller- als auch auf Proteinebene durch hohe Osmolarität stimuliert (Sleator *et al.*, 2000; Verheul *et al.*, 1997). Anders als OpuD transportiert BetL keine Strukturanaloga von Glycin Betain, sondern ist spezifisch für diese Verbindung (Sleator *et al.*, 1999). Die beiden übrigen Transportsysteme aus *L. monocytogenes* (Gbu und OpuC) sind Mitglieder der ABC-Transporter-Familie und ähneln insofern OpuA und OpuC aus *B. subtilis*. Analysen von Mehrfachmutanten in *L. monocytogenes* deuten darauf hin, dass Gbu, ähnlich wie OpuA aus *B. subtilis*, den Haupttransporter für kompatible Solute darstellt (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002).

Eine Besonderheit der Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *L. monocytogenes* ist ihre vermutlich ausschließliche Kontrolle über den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  (Becker *et al.*, 1998). Das unterscheidet sie von den Transportsystemen in *B. subtilis* oder *E. coli*, die entweder ausschließlich von Promotoren aus transkribiert werden, die von dem vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  erkannt werden, bzw. zusätzlich dazu einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor aufweisen (Spiegelhalter & Bremer, 1998; von Blohn *et al.*, 1997).

Die Identifizierung von Transportsystemen zur Aufnahme osmoprotektiver Substanzen erfolgte in *L. lactis* mit Hilfe von Transposonmutagenese (Obis *et al.*, 1999). Dieser Ansatz führte zu dem Ergebnis, dass *L. lactis* zur Aufnahme kompatibler Solute einen einzigen Transporter (BusA, teilweise auch als OpuA bezeichnet) rekrutiert, der zur Familie der ABC-Transporter zählt. Auf Proteinebene zeigt BusA deutliche Homologien zu OpuA aus *B. subtilis*, aber eine nähere Analyse des *busA*-Genclusters ergab, dass es lediglich zwei Polypeptide codiert. Im Gegensatz zum OpuA Transportsystem aus *B. subtilis* ist in BusA das Substratbindeprotein an das carboxyterminale Ende der Transmembrankomponente fusioniert. Weitergehende Sequenzvergleiche führten zu dem Ergebnis, dass die beiden Hälften des Substratbindeproteins im Vergleich zu OpuAC invertiert sind (Obis *et al.*, 1999). BusA war der erste bakterielle ABC-Transporter, der einen chimären Substratbinde/Translokator-Komplex aufwies. Datenbankanalysen zeigten aber, dass sich in zahlreichen anderen Organismen offene Leserahmen finden, die wahrscheinlich ebenfalls für ABC-Transporter dieser Art codieren (Obis *et al.*, 1999). Das lässt darauf schließen, dass der in *L. lactis* identifizierte ABC-Transporter zu einer neuen funktionellen Organisation innerhalb der bakteriellen ABC-Transporter gehört. Die Analyse der kinetischen Parameter von BusA

ergab, dass BusA ein hochaffines Aufnahmesystem für Glycin Betain darstellt. Die Transportrate wird analog zu den bisher charakterisierten Aufnahmesystemen für kompatible Solute sowohl durch transkriptionelle Induktion als auch durch Aktivierung des Transports unter hochosmolaren Bedingungen gesteigert (van der Heide & Poolman, 2000).

Die hier exemplarisch dargestellten Transportsysteme stellen nur eine Auswahl der in Bacteria charakterisierten Transportsysteme für kompatible Solute dar. Das macht deutlich, dass die molekularen Grundlagen zur Aufnahme kompatibler Solute in diesem Reich gut untersucht sind. Ganz anders stellt sich die Situation in Archaea dar: es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass Archaea als Antwort auf osmotischen Stress ebenfalls kompatible Solute aus der Umwelt akkumulieren (Martin *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 1997), aber bis vor kurzem war auf molekularer Ebene noch kein Aufnahmesystem für diese Verbindung charakterisiert worden. Glycin Betain wurde bereits vor längerer Zeit in methanogenen Archaea als Osmoprotektivum detektiert (Robertson *et al.*, 1990), Untersuchungen zur Aufnahme dieser Verbindung wurden aber erst später in *Methanosarcina thermophila* durchgeführt (Proctor *et al.*, 1997). Diese Analysen ließen darauf schließen, dass *M. thermophila* ein hochaffines Transportsystem für Glycin Betain zur Verfügung steht, das wahrscheinlich als sekundärer Transporter arbeitet, da seine Funktion abhängig von einem elektrochemischen Ionengradienten ist (Proctor *et al.*, 1997). Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Aktivität des Transporters durch eine Erhöhung der externen Osmolarität gesteigert wird. Die Gene, die für diesen Transporter codieren sind jedoch bis heute nicht identifiziert worden. Der erste und bisher einzige Transporter für kompatible Solute, der in Archaea auch auf molekularer Ebene charakterisiert wurde, ist der Ota-Transporter aus *Methanosarcina mazei* Gö1 (Roessler *et al.*, 2002). Nachdem gezeigt werden konnte, dass Glycin Betain das Wachstum von *M. mazei* bei erhöhter Osmolarität fördert und die Aufnahme der Verbindung durch hohe Osmolarität stimuliert wird, wurde in dem komplett sequenzierten Genom von *M. mazei* (Deppenmeier *et al.*, 2002) nach möglichen Aufnahmesystemen für kompatible Solute gesucht. Dabei stellte sich heraus, dass in *M. mazei* ein Gencluster existiert, dessen abgeleitete Produkte deutliche Homologien zu den Untereinheiten des Glycin Betain-Aufnahmesystems OpuA aus *B. subtilis* aufweisen. Der Ota-Transporter besteht wie OpuA aus *B. subtilis* aus einem putativen Substratbindeprotein (OtaC), einer Transmembrankomponente (OtaB) und einer ATPase (OtaA). Da die Transkription von *otaC* durch erhöhte Osmolarität stimuliert wird, gehen Roessler *et al.* (2002) davon aus, dass der Ota-Transporter zumindest für einen Teil der Glycin Betain Aufnahme bei hoher Osmolarität verantwortlich ist. Weitergehende Untersuchungen zur Substratspezifität des Ota Transporters

und zum Vorkommen anderer Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *M. mazei* stehen noch aus.

## 1.7 Aktivierung der Aufnahmesystemen für kompatible Solute

Hyperosmotische Wachstumsbedingungen bewirken sowohl eine transkriptionelle Aktivierung der Gene der meisten hier beschriebenen Aufnahmesysteme als auch eine direkte Stimulation der Transporter für kompatible Solute. Dazu muss osmotischer Stress wahrgenommen und das Signal prozessiert werden, um letztendlich zur Aktivierung der entsprechenden Vorgänge beizutragen (Poolman & Glaasker, 1998). Bis heute ist weitgehend unverstanden, wie die Aktivierung auf transkriptioneller Ebene abläuft. Zur Aktivierung der Transporter an sich gibt es aber eine Reihe von Untersuchungen. In Hinblick auf die Stimulation der katalytischen Aktivität als Antwort auf osmotischen Stress sind die beiden sekundären Aufnahmesysteme BetP aus *C. glutamicum* und ProP aus *E. coli* und der ABC-Transporter OpuA (BusA) aus *L. lactis* gut untersucht. Alle drei Transporter wurden heterolog exprimiert und ihre Aktivität und osmotische Stimulierbarkeit wurde in Proteoliposomen untersucht (Racher *et al.*, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide & Poolman, 2000). Dabei stellte sich heraus, dass BetP, ProP und OpuA gleichzeitig als Osmosensoren und als Osmoregulatoren fungieren, da neben den Transportern selbst und der Membran keine zusätzlichen Faktoren für die osmotische Stimulierbarkeit benötigt werden. Es stellt sich die Frage, welchen Stimulus diese Osmosensoren bei hyperosmotischen Bedingungen wahrnehmen. Prinzipiell sind zwei Arten der Wahrnehmung denkbar. Osmosensoren könnten direkt die Veränderung der externen Wasseraktivität wahrnehmen (direktes „osmosensing“), oder auf sekundäre Konsequenzen einer Erhöhung der Osmolarität reagieren (indirektes „osmosensing“) (Wood, 1999). Da die drei Transporter in der Membran lokalisiert sind, kommen als Stimuli Veränderungen der intrazellulären oder extrazellulären Wasseraktivität und damit verbundene Änderungen des osmotischen Gradienten über die Membran, Änderungen des lateralen Drucks in der Membran oder Modifikationen der intrazellulären Solutzusammensetzung in Betracht (Wood, 1999).

In BetP ist die osmotische Stimulierbarkeit abhängig von den C- und N-Termini, die an der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind (Peter *et al.*, 1998), während die Stimulierbarkeit von ProP abhängig von einer carboxyterminalen Extension ist, die ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert ist (Culham *et al.*, 2000). Weitergehende Untersuchungen in

Proteoliposomen führten zu dem Ergebnis, dass die interne  $K^+$ -Konzentration in den Vesikeln für die osmoreaktive Aktivierung von BetP verantwortlich ist (Rübenhagen *et al.*, 2001). Damit nimmt BetP Veränderungen der internen Solutzusammensetzung wahr. In ProP stellt sich die Situation etwas komplizierter dar, da seine Aktivität *in vivo* von einem weiteren Protein (ProQ) abhängt. Da eine Aktivierung von ProP aber auch in Abwesenheit dieses Proteins in Proteoliposomen stattfindet, wird ProQ lediglich eine Aufgabe bei der Feinregulation der Aktivität zugeschrieben (Wood, 1999). Die Signale, die zur Stimulation der Aktivität von ProP beitragen, konnten bis heute nicht eindeutig identifiziert werden, es gibt aber Hinweise darauf, dass ebenfalls  $K^+$  als Signal in Betracht kommt (Wood, 1999). Die osmoreaktive Aktivierung von OpuA aus *L. lactis* beruht dagegen offenbar auf Änderungen Membranspannung (van der Heide & Poolman, 2000).

## 1.8 *Archaeoglobus fulgidus* und seine Reaktion auf osmotischen Stress

In hyperthermophilen Archaea ist die Akkumulation kompatibler Solute durch *de novo* Synthese relativ gut charakterisiert (Martin *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 1997; Santos & Da Costa, 2002), über Aufnahmesysteme für diese Verbindungen liegen aber bisher keine Daten vor. Durch die Verfügbarkeit vieler Genomsequenzen hyperthermophiler Archaea ist es möglich, mit Hilfe von Datenbankanalysen gezielt nach putativen Transportern zur Aufnahme kompatibler Solute zu suchen. Im Genom von *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) findet sich das Gencluster *proU* (bestehend aus den Genen *proX*, *proV*, *proW2* und *proW1*), dessen Produkte signifikante Sequenzidentitäten zu den Untereinheiten von Transportsystemen für kompatible Solute verschiedener Mikroorganismen aufweisen. Dabei zeigt der oben vorgestellte Ota-Transporter aus *M. mazei* die größte Sequenzidentität, aber auch mit dem OpuC-Transporter aus *B. subtilis* gibt es deutliche Übereinstimmungen. Es ist davon auszugehen, dass der Transporter aus dem Substratbindeprotein ProX, der ATPase ProV und den beiden Transmembranproteinen ProW1 und ProW2 aufgebaut ist. In Analogie zu dem Glycin Betain-Transporter ProU aus *E. coli* wurde der putative Transporter in *A. fulgidus* ebenfalls als „ProU“ annotiert (Klenk *et al.*, 1997). Da die Analyse und Charakterisierung des ProU-Transporters aus *A. fulgidus* im Hinblick auf seine Substratspezifität und die physiologische Bedeutung für den Organismus Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden. Was



bisher in *A. fulgidus* über die Akkumulation kompatibler Solute und die Anpassung an osmotischen Stress bekannt ist, wird im folgenden erläutert.

*A. fulgidus* ist ein mariner hyperthermophiler Sulfat-Reduzierer, der aus der Nähe hydrothermalen Quellen isoliert wurde und ein Wachstumsoptimum von 83°C aufweist (Achenbach-Richter *et al.*, 1987; Stetter, 1988; Stetter *et al.*, 1987). Dieses strikt anaerobe Archaeon nutzt Sulfat oder Thiosulfat als terminalen Elektronenakzeptor und ist in der Lage auf einer Reihe verschiedener organischer Substrate (wie z. B. Laktat, verschiedene Aminosäuren oder Glukose), zu wachsen (Stetter *et al.*, 1987).

Als mariner Organismus ist *A. fulgidus*, im Vergleich zu Organismen aus Frischwasserhabitaten, permanent einer erhöhten Salinität ausgesetzt und daher leicht halophil (d.h. er ist auf NaCl im Medium angewiesen) (Stetter *et al.*, 1987). Da *A. fulgidus* sein Habitat in der Nähe hydrothermalen Quellen hat, ist er auch Schwankungen in Salzgehalt und Temperatur des umgebenden Mediums ausgesetzt und muss demzufolge in der Lage sein, sich solchen Veränderungen effektiv anzupassen. Die meisten Studien zur Osmoadaptation in Archaea beschränkten sich auf die Identifizierung kompatibler Solute und daher ist über die Physiologie der Osmostressantwort wenig bekannt (Roessler & Müller, 2001). So ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob als initiale Antwort auf hyperosmotische Bedingungen in Archaea ebenfalls K<sup>+</sup> akkumuliert wird.

Untersuchungen in *A. fulgidus* haben gezeigt, dass als dominante kompatible Solute vornehmlich Di-myoinositolphosphat (DIP) und Diglycerolphosphat (DGP) (Abb. 1) auftreten (Martins *et al.*, 1997; Santos & Da Costa, 2002). DGP ist eine seltene Verbindung, deren Synthese bisher ausschließlich in *A. fulgidus* nachgewiesen wurde, und die dem Organismus offenbar als Osmoprotektivum dient, da die Menge des angehäuften DGPs sich proportional zu der Osmolarität des umgebenden Mediums verhält (Martins *et al.*, 1997). Der Gehalt an DIP wird im Gegensatz dazu vom Salzgehalt des Mediums kaum beeinflusst, DIP wird aber zum dominanten Solut, wenn *A. fulgidus* bei supraoptimalen Temperaturen (z.B. 87°C) kultiviert wird (Martins *et al.*, 1997). Unter diesen Bedingungen steigt auch die Menge an DGP, was darauf hindeutet, dass es neben seiner Funktion als Osmoprotektivum auch hitzeprotektiv wirkt. Andere Solute konnten in *A. fulgidus* bislang nur in geringen Mengen nachgewiesen werden und Aufnahmesysteme für diese Verbindungen sind in *A. fulgidus* bisher nicht charakterisiert worden.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Kompatible Solute werden in Bacteria, Eukarya und Archaea zu osmoprotektiven Zwecken akkumuliert (Bohnert, 1995; Kempf & Bremer, 1998b; Roberts, 2000). In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass diese Verbindungen Organismen nicht allein vor hoher Osmolarität schützen, sondern auch als Kälte- und Hitzeprotektiva dienen und Zellen ferner vor Schäden durch freie Radikale oder Austrocknung bewahren (Welsh, 2000). Kompatiblen Soluten kommt damit eher die Rolle allgemeiner Stressprotektiva zu.

Aufnahmesysteme für diese Verbindungen sind in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gut charakterisiert, im Reich der Archaea wurde aber bisher nur ein Transporter für kompatible Solute auf molekularer Ebene charakterisiert (Roessler *et al.*, 2002). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Produkte eines Genclusters (*proU*) aus *A. fulgidus* näher zu analysieren, die deutliche Homologien zu bereits charakterisierten Aufnahmesystemen für kompatible Solute aufweisen. Zur näheren Charakterisierung des Transporters sollte zunächst das putative Bindeprotein heterolog überproduziert und gereinigt werden, damit es in Hinblick auf Substratspezifität und kinetische Parameter näher untersucht werden konnte. Zudem sollte versucht werden, das Bindeprotein zu kristallisieren, um auf diese Weise Einblicke in die Art der Substratbindung zu gewinnen. Da in *A. fulgidus* bisher kein Aufnahmesystem für kompatible Solute charakterisiert werden konnte, war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, ob der ProU-Transporter in *A. fulgidus* in die Osmoadaptation involviert ist oder ob ihm eine andere physiologische Rolle zukommt.

Die hitzeprotektive Wirkung kompatibler Soluten wurde bisher in nur wenigen Organismen untersucht. Dabei wurde in den meisten Fällen lediglich analysiert, ob gewisse kompatible Solute auch thermoprotektives Potential haben. Welche Aufnahmesysteme unter diesen Bedingungen zum Einsatz kommen und inwiefern der Transport durch Hitzestress beeinflusst wird, blieb ungeklärt. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher in *B. subtilis* die Nutzung kompatibler Solute unter Hitzestress näher analysiert werden. Da im Rahmen von Untersuchungen zur Osmostressantwort in *B. subtilis* fünf Transportsysteme zur Aufnahme kompatibler Solute charakterisiert wurden (Kempf & Bremer, 1998a), ist es ein idealer Kandidat zur Charakterisierung der Bedeutung dieser Transportsystemen unter Hitzestress und zur Analyse der Regulation der Aufnahme kompatibler Solute durch supraoptimale Temperaturen. Weiterhin sollte geklärt werden, welchen Effekt Hitzestress in *B. subtilis* auf die Akkumulation *de novo* synthetisierter Solute ausübt.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Chemikalien und Reagenzien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen). Die Bestandteile von Komplexmedien stammten von Becton Dickinson (Augsburg). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), NEB (Schwalbach), Eppendorf (Hamburg), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen. Gase stammten von Messer (Düsseldorf).

##### 1.1 Verwendete kompatible Solute

Glycin Betain,  $\gamma$ -Butyrobetain und Cholinchlorid wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Prolinbetain (Stachydrinhydrochlorid) stammte von Extrasynthese (Frankreich). Ectoin und Hydroxyectoin waren von BIOMOL (Hamburg). Crotonobetain wurde von Lonza (Basel, Schweiz) bezogen. DMSP wurde freundlicherweise von T. Bernard (Universität Rennes, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Cholin-*O*-sulfat und Homobetain wurden von G. Nau-Wagner (Universität Marburg) synthetisiert (Bellenger *et al.*, 1968).

##### 1.2 Radiochemikalien

[1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain (55 mCi/mmol) stammte von American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, Mo; USA), L-[1-<sup>14</sup>C]-Glutamat (45 mCi/mmol) wurde von DuPont (Boston, Ma, USA) bezogen.

#### 2. Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

Der verwendete *Archaeoglobus fulgidus*-Stamm war der Typstamm VC16 (DSMZ 4304). Er wurde von K.O. Stetter (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten *Escherichia coli* Stämme sind der Tabelle 1, die *Bacillus subtilis* Stämme der Tabelle 2 zu entnehmen. Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden sind in Tabelle 3, Oligonukleotide in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab. 1:** *E. coli* Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ) <i>hsdR17recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
MC4100	F <sup>-</sup> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i> <i>araD139</i> <i>rpsL150</i> <i>ptsF25flbB5301</i> <i>rbsR</i> <i>deoC1</i> <i>relA1</i>	(Casadaban, 1976)
MKH13	MC4100 $\Delta$ ( <i>betTIBA</i> ) <sup>a</sup> <i>U169</i> $\Delta$ ( <i>putPA</i> ) <i>101</i> $\Delta$ ( <i>proP</i> ) <i>2</i> $\Delta$ ( <i>proU</i> ) <i>608</i> [Sp <sup>c</sup> ]	(Haardt <i>et al.</i> , 1995)
BL21 Codon Plus RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [ <i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene (Heidelberg)

a: *bet TIBA* Gencluster wird durch  $\Delta$ (*argF-lac*) *U169* aus dem Genom von MC4100 entfernt.

**Tab. 2:** *B. subtilis* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
JH642	<i>trpC2 phe A1</i>	BGSC <sup>a</sup> , 1A96
JSB8	JH642 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{neo})1$	(Brill, 2001)
JBB5	JH642 $\Delta(\textit{gbsAB}::\textit{neo})2$	(Boch <i>et al.</i> , 1996)
RMKB20	JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm})4 \textit{opuC-20}::\textit{Tn10}(\textit{spc}) \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$	(Kappes <i>et al.</i> , 1999)
RMKB22	JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm opuB-20}::\textit{Tn10}(\textit{spc}) \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$	(Kappes <i>et al.</i> , 1999)
RMKB24	JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm})4 \Delta(\textit{opuBD}::\textit{tet})23 \textit{opuC-10}::\textit{Tn10}(\textit{spc}) \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$	(Kappes <i>et al.</i> , 1999)
RMKB33	JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm})4 \Delta(\textit{opuBD}::\textit{tet})23 \textit{opuC-20Tn10}(\textit{spc})$	(Kappes <i>et al.</i> , 1999)
RMKB34	JH642 $\Delta(\textit{opuBD}::\textit{tet})23 \textit{opuC-20}::\textit{Tn10}(\textit{spc}) \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$	(Kappes <i>et al.</i> , 1999)

<sup>a</sup>: Bacillus genetic stock center, Columbus, Ohio, USA.

**Tab. 3:** Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pASKIBA6	Überexpressionsvektor mit Strep-Tag und <i>ompA</i> - Signalsequenz	(Skerra, 1994)
pJoe2702	Überexpressionsvektor mit Rhamnose-induzierbarem Promotor	(Strumpp <i>et al.</i> , 2001)
pBSK <sup>-</sup>	pBluescript <sup>®</sup> II SK <sup>-</sup> , Klonierungsvektor	Stratagene (Heidelberg)
pJS13	Derivat von pBSK <sup>-</sup> , trägt ' <i>rtp proH proJ gltC</i> '	(Brill, 1998)
pFSB66	Derivat von pBSK <sup>-</sup> , trägt ' <i>proB proA</i> '	(Brill, 2001)
pGH26	pASK IBA6 Derivat, trägt <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i>	diese Arbeit
pGH22	pJoe2702 Derivat, trägt <i>proU</i> -Gencluster aus <i>A. fulgidus</i>	diese Arbeit

**Tab. 4:** Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Lage, Bemerkung
Iba6 <i>proX</i> fwd.	AAAAAAGGTCTCAGCGCGGATC CCAATCATCTGAGAG	5' Bereich von <i>proX</i> , führt <i>BsaI</i> Schnittstelle ein
Iba6 <i>proX</i> rev.	AAAAAAGGTCTCATATCATCAT TTAACGAGTCCCTGCT	3' Bereich von <i>proX</i> führt <i>BsaI</i> Schnittstelle ein
<i>proU</i> fwd. <i>NdeI</i> Joe	GGAATTCCATATGAGGTGGAAG TTGCTTTTTTG	5' Bereich von <i>proX</i> , führt <i>NdeI</i> Schnittstelle ein
<i>proU</i> rev. <i>BamHI</i> Joe	CGCGGATCCTTAACGAGAAGAA TTATCTG	3' Bereich von <i>proW1</i> , führt <i>BamHI</i> Schnittstelle ein
<i>proHJ</i> Sonde fwd.	CAGAGCGATTAACCTGAAC	im 5' Bereich von <i>proH</i>
<i>proHJ</i> Sonde rev.	TAATACGACTCACTATAGGGAG GTAATAAAAATACGCGGGTCC	im 3' Bereich von <i>proH</i> führt T7 Promotorsequenz ein
<i>opuAA</i> for 195	GGGTCTATCAGGGAGCGG	im 5' Bereich von <i>opuAA</i>
<i>opuAA</i> rev 696 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAG GCTGTGCGCCGATCCGCAACGC	im 3' Bereich von <i>opuAA</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>opuBC</i> 26 for	GATAGGTTTAGCACTTGCGGC	im 5' Bereich von <i>opuBC</i>

Fortsetzung Tabelle 4

Oligonukleotid	Sequenz	Lage, Bemerkung
<i>opuBC</i> 598 rev T7	TAATACGACTCACTATAGGGAG GGCATCGGATACGTGCCCGCG	im 3' Bereich von <i>opuBC</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>opuCC</i> 17 for <i>opuCC</i> 519 rev T7	GGCTTGGCGCGTTTGCTCTC TAATACGACTCACTATAGGGAG GCAGCCAAGCATTGTGACGCC	im 5' Bereich von <i>opuCC</i> im 3' Bereich von <i>opuCC</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>opuD</i> 277 for <i>opuD</i> 807 rev T7	GCGCAGGCATGGGAATCG TAATACGACTCACTATAGGGAG GATCAGCACTGTAGGCCCGAC	im 5' Bereich von <i>opuD</i> im 3' Bereich von <i>opuD</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>opuE</i> 105 for <i>opuE</i> 588 rev T7	GGAGGAAGAGGCCTCGGA TAATACGACTCACTATAGGGAG GGCAACGATCGGCACAAGCAC	im 5' Bereich von <i>opuE</i> im 3' Bereich von <i>opuE</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>trnB</i> -Ala-T7 for <i>trnB</i> -Ala-Probe rev	GGGGCCTTAGCTCAGCT TAATACGACTCACTATAGGGAG GAAGTGGAGCCTAGCGGG	5' Bereich von <i>trnB</i> 3' Bereich von <i>trnB</i> , führt T7 Promotorsequenz ein
<i>proHJ</i> -PE2 <sup>a</sup>	GGCTACTTTCTTTTGATCAAAG ATCGG	im 5' Bereich von <i>proH</i> , für Primerextension
pASK-IBA forward <sup>a</sup>	GTGAAATGAATAGTTCGAC	Sequenzierprimer für pASKIBA- Vektoren
pASK-IBA- reverse <sup>a</sup>	CGCAGTAGCGGTAAACGG	Sequenzierprimer für pASKIBA- Vektoren
pJoe fwd. <sup>a</sup>	AAGGTCGCGAATTCAGGCGC	Sequenzierprimer für pJoe- Vektoren
pJoe rev. <sup>a</sup>	AAAATCTTCTCTCATCCGCC	Sequenzierprimer für pJoe- Vektoren
Seq. VW fwd. <sup>a</sup>	AGTCATTGTGGGAGTGCTCC	Sequenzierprimer für <i>proU</i> -Region
Seq. VW rev. <sup>a</sup>	GAGCACTCCCACAATGACTG	Sequenzierprimer für <i>proU</i> -Region

<sup>a</sup>: Oligonukleotide, die für Sequenzreaktionen bzw. Primerextension Reaktionen verwendet wurden, sind am 5' Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD800 (Infrared dye 800) markiert. Diese Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen

### 3. Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

#### 3.1 Medien

##### 3.1.1 Vollmedien

Die Vollmedien Luria-Bertani-Broth (LB) und Double Yeast Tryptone (DYT) wurden wie beschrieben hergestellt (Miller, 1992; Sambrook *et al.*, 1989). Festmedien enthielten zusätzlich 15 g/l Agar.

##### 3.1.2 Minimalmedien

Als definiertes Minimalmedium für *B. subtilis* diente Spizizen's Minimalmedium (SMM) (Spizizen, 1958) mit zusätzlichen Spurenelementen (Haarwood & Archibald, 1990). Als C-Quelle wurde 0,5 % Glucose zugefügt. Zur Komplementation zweier Auxotrophien des *B. subtilis*-Stammes JH642 (*trpC2 pheA1*) und seiner Derivate wurden dem Medium Tryptophan (18 mg/l) und Phenylalanin (20 mg/l) zugesetzt.

Für die heterologe Überproduktion von ProX in *E. coli* wurde Minimalmedium A (MMA) (Miller, 1992) verwendet, dem 0,5 % Glucose und 0,5 % Casaminsäuren und 1 mg l<sup>-1</sup> Thiamin zugefügt wurden. Für die Überproduktion, die zum Markieren von ProX mit Selenomethionin diente, wurde modifiziertes M9 Medium (6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,5 g NaCl pro Liter) verwendet. Nach dem Autoklavieren wurde 1 % Glucose als Kohlenstoffquelle, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg l<sup>-1</sup> Thiamin und 4,2 mg l<sup>-1</sup> FeIIISO<sub>4</sub> zugegeben. Als Minimalmedium für die Anzucht von *A. fulgidus* diente ein leicht modifiziertes, bereits beschriebenes Medium (Stetter *et al.*, 1987) mit 10 mM Laktat als Kohlenstoffquelle. Das Medium enthielt (pro Liter) 100 ml Basalsalzlösung (Tab. 5) und 10 ml Spurenelementlösung (Tab. 6)

**Tab. 5:** Zusammensetzung der zehnfachen Basalsalzlösung (1 Liter)

Substanz	Menge
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	74 g
KCl	3,4 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	27,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
NaCl	180 g
Resazurin 0,2 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	5 ml

**Tab. 6:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung (1 Liter)

Substanz	Menge
Titriplex I	1,5 g <sup>a</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3,0 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,45 g
NaCl	1,0 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,18 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,18 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01 g
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaWO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,01 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,3 g

<sup>a</sup>: Titriplex I wurde in Wasser gelöst, der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt und danach die anderen Substanzen gelöst. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

Das Medium wurde mit 25 %-iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und anschließend mit  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (80:20,v/v) begast. Nach Hitzesterilisation wurde das Medium durch die Zugabe von 0,5 ml einer 0,5 M  $\text{Na}_2\text{S}$  und 0,5 ml einer 0,5 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  Lösung reduziert. Da das Medium für die geplanten Experimente keine kompatiblen Solute enthalten durfte, wurde der Hefeextrakt, der Glycin Betain enthält (Dulaney *et al.*, 1968), durch eine definierte Vitaminlösung (Tab. 7) ersetzt. Von dieser Vitaminlösung wurden 10 ml auf einen Liter Medium gegeben. Die Osmolarität des Mediums wurde durch die Zugabe von NaCl zu den angegebenen Endkonzentrationen eingestellt.

**Tab. 7:** Zusammensetzung der Vitaminlösung (1 Liter)

Substanz	Menge
Biotin	2 mg
Folsäure	10 mg
Pyridoxinhydrochlorid	5 mg
Thiaminhydrochlorid x 2 $\text{H}_2\text{O}$	5 mg
Riboflavin	5 mg
D-Calcium-pantothersäure	5 mg
Cobalamin	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5 mg
Liponsäure	5 mg
Nicotinsäure	5 mg

### 3.2 Kompatible Solute und Antibiotika

Den Medien wurden bei Bedarf die in Tabelle 5 aufgelisteten kompatiblen Solute bzw. Antibiotika zu den angegebenen Endkonzentrationen aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Tetracyclin und Chloramphenicol wurden in Ethanol gelöst, alle anderen Substanzen in  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tab. 8:** Kompatible Solute und Antibiotika

Substanz	Endkonzentration		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. fulgidus</i>
Glycin Betain	20 $\mu\text{M}$ -1 mM	-	1 mM-10 mM
Prolin Betain	1 mM	-	2 mM
Cholinchlorid	1 mM	-	2 mM
Carnitin	1 mM	-	2 mM
Prolin	1 mM	-	2 mM
Homobetain	1 mM	-	-
Crotonobetain	1 mM	-	-
$\gamma$ -Butyrobetain	1 mM	-	-
Cholin-o-sulfat	1 mM	-	-
DMSP	1 mM	-	-
Ectoin	1 mM	-	-
Hydroxyectoin	1 mM	-	-
Ampicillin	-	150 $\mu\text{g/ml}$	-
Chloramphenicol	5 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	-
Kanamycin	5 $\mu\text{g/ml}$	-	-
Tetracyclin	15 $\mu\text{g/ml}$	-	-
Spectinomycin	100 $\mu\text{g/ml}$	-	-

### 3.3 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Puffer für 20 Minuten bei 121°C und einem bar Überdruck dampfsterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert und Glaswaren für 3 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

### 3.4 Wachstum

#### 3.4.1 Wachstumsbedingungen für *E. coli*, *B. subtilis* und *A. fulgidus*

##### *E. coli*:

Kulturen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen auf einem Roller inkubiert. Kulturvolumina von 20-500 ml wurden in Erlenmeyerkolben in Wasserbädern bzw. Luftinkubatoren mit 220 rpm geschüttelt. Überexpressionskulturen von 2 l wurden in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Rührfisch versehen und auf einem Magnetrührer durch Rühren belüftet. Die Anzucht der Zellen erfolgte in allen Fällen bei 37°C.

##### *B. subtilis*:

Kleine Kulturvolumina (15-20 ml) wurden über Nacht bei 37°C in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Für Wachstumskurven bei 37°C wurden 75 ml vorgewärmtes Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit exponentiell wachsenden Zellen ( $OD_{578}$  0,5-1,5) auf eine optische Dichte von 0,1 inokuliert und das Wachstum wurde über die Zeit durch Messung der optischen Dichte verfolgt. Für Wachstumskurven bei 52°C wurden 75 ml Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit exponentiell wachsenden Vorkulturen (gezogen bei 37°C) angeimpft und innerhalb von 15 Minuten von 37°C auf 52°C erwärmt. Das weitere Wachstum wurde bei 52°C verfolgt.

##### *A. fulgidus*:

*A. fulgidus* wurde anaerob bei 83°C bzw. 90°C in 100 ml Serumflaschen mit 50 ml Medium gezogen. Für Wachstumsexperimente wurde das auf die entsprechende Temperatur vorgewärmte Medium mit 5 % exponentiell wachsenden *A. fulgidus* Zellen beimpft und die Zellen wurden bei der jeweils angegebenen Temperatur wachsen gelassen.

#### 3.4.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur von *E. coli* bzw. *B. subtilis* wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte in einem Spektralphotometer (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 578 ( $OD_{578}$ ) nm bestimmt. Die Zelldichte von *A. fulgidus* Kulturen wurde durch direktes Auszählen in einer Helber-Zählkammer ermittelt.



## 4. Molekularbiologische und genetische Methoden

### 4.1 Präparation von DNA und Gesamt RNA

#### 4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) angewandt. Plasmid DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde über das QIAGEN Plasmid-Midi-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert.

#### 4.1.2 Präparation chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *B. subtilis* wurde aus 10 ml Kultur mit Hilfe von DNA-bindenden Säulen (tip-20, QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert.

#### 4.1.3 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *B. subtilis* wurde aus exponentiell wachsenden ( $OD_{578}$  0,5-1) Zellen isoliert. Die Zellen wurden in SMM unter den jeweils angegebenen Bedingungen gezogen und beim Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurden 20-40 ml der Kultur für fünf Minuten bei 4°C und 3000 g abzentrifugiert. Die Ernte von *B. subtilis* Zellen, die bei 52°C gezogen wurden erfolgte bei Raumtemperatur. Die erhaltenen Pellets wurden direkt in einem Trockeneis/Ethanol-Bad schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte nach einer modifizierten sauren Phenol-Methode (Ambulos *et al.*, 1987; Majumdar *et al.*, 1991). Hierbei wurden die Zellpellets in 1 ml Puffer 1 (25 % Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH8, 0,25 mM EDTA) resuspendiert und mit 1 mg Lysozym versetzt. Die Suspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 4°C und 6000 g zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 300 µl Puffer 2 (3 mM EDTA, 200 mM NaCl) resuspendiert und mit 300 µl auf 95°C vorgewärmten Puffer 2 mit 1 % SDS versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 600 µl saures Phenol (Roth, Karlsruhe) zugegeben und die Suspension wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch drei minütige Zentrifugation bei 21000 g beschleunigt und die Phenolextraktion wurde mit der wässrigen Phase wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase mit Chloroform Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und 5 Minuten geschüttelt. Die Suspension wurde ebenfalls zur Phasentrennung zentrifugiert, die wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH5,2) versetzt und die RNA wurde mit 2,5 Volumen 96 % igem Ethanol präzipitiert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 10000 g wurde die erhaltene RNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Das RNA Pellet wurde dann in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

#### 4.1.4 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) durch die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine  $A_{260}$  von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg ml<sup>-1</sup> und einer RNA-Konzentration von 40 µg ml<sup>-1</sup>. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

## 4.2 Klonierungstechniken

### 4.2.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Ansätze von 20-100 µl Gesamtvolumen verwendet. Pro µg eingesetzter DNA wurde mindestens eine Enzymeinheit (U) Restriktionsenzym eingesetzt und im entsprechenden Puffer für 2 Stunden bzw. über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

### 4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 0,7-2 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandard diente mit *Bst*EII geschnittene λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die DNA wurde 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt, durch UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Kamera und einem Videoprinter (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

### 4.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese in „low-melting“-Agarose (peqlab, Erlangen) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und die entsprechende Bande über UV-Licht ausgeschnitten. Das Gelstück wurde bei 70°C geschmolzen und mit 1ml Resin (66,84 g Guanidin-Hydrochlorid in 33,3 ml Merlin III Puffer (61,35 g Kaliumacetat, 35,7 ml Essigsäure ad 500 ml H<sub>2</sub>O)) mit 2 g Diatomeenerde (ICN, Ohio, USA) versetzt und 15 Minuten unter gelegentlichem Invertieren bei Raumtemperatur inkubiert. Die mit DNA beladene Diatomeenerde wurde von der übrigen Lösung mit Hilfe von Filtersäulchen (Promega, Mannheim) getrennt und mit 80 %-igem Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 40 µl H<sub>2</sub>O von den Säulchen eluiert.

### 4.2.4 Ligationen

Ligationen erfolgten mit etwa 100 ng Vektor-DNA und einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragmentes. Die 20 µl Ligationsreaktionen wurden 2-16 Stunden bei 16°C in Ligationspuffer mit 1 Enzymeinheit Ligase (Roche, Mannheim) inkubiert.

### 4.2.5 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen erfolgte wie bei Ausubel *et al.* (1994) beschrieben. Vor der Transformation wurden die Ligationsansätze mit Hilfe von Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,02 µm (Typ VS, Millipore, Schwalbach) gegen destilliertes Wasser dialysiert, um Salze zu entfernen. Anschließend erfolgte die Transformation mittels Elektroporation mit dem „BioRad-Gene-Pulser™“ (BioRad, München). Dabei wurde nach Herstellerangaben („Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual. Version 1.0“) verfahren.

### 4.3 Polymerasekettenreaktion und Bestimmung der Nukleotidsequenz

#### 4.3.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion nach Standardprotokollen (White, 1993) eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-DNA-Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. der Pfu-Turbo® DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) in einem „Trio-Thermoblock-Cycler“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

#### 4.3.2 DNA-Sequenzierung

Nukleotidsequenzen wurden über die Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) bestimmt. Dabei wurde das „Thermo Sequenase™ DYEnamic direct cycle sequencing kit mit 7-deaza-GTP“ (Amersham Biosciences) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 4 zu entnehmen. In die Sequenzreaktion wurden 2 pmol Oligonukleotide und pro Kilobase Plasmid 0,5 µg DNA eingesetzt. Für die Auftrennung der Produkte und deren Detektion wurde ein LiCOR® DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG, Ebersberg) verwendet. Die Sequenzgele wurden aus Sequagel XR ultra pure und Sequagel complete ultra pure (Biozym, Hameln) nach Angaben des Herstellers gefertigt. Für das Einlesen des Gellaufes und die anschließende halbautomatische Ermittlung der Sequenz wurde die ImageIR™-Software von MWG verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Lasergene Programme von DNASTar Ltd. weiterverarbeitet.

### 4.4 Analyse von Gesamt-RNA durch Northern-transfer und -hybridisierung

#### 4.4.1 Herstellung der RNA-Sonden

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Sonden handelte es sich um einzelsträngige DIG-markierte RNA Sonden. Die Sonden wurden über *in vitro*-Transkription unter Verwendung des „StripEZ™-T7 RNA kit“ (Ambion, Austin, Tx, USA) hergestellt. Als Matrize für die *in vitro* Transkription dienten entweder PCR-Produkte oder linearisierte Plasmide, die eine T7 Promotorsequenz trugen. Die Orientierung des T7-Promotors wurde so gewählt, dass antisense-Sonden generiert wurden. Vor der Verwendung als Matrize wurden die PCR-produkte bzw. Plasmide über das „QIAquick PCR-Purification kit“ (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Als DIG-markiertes Nukleotid wurde UTP (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut. Die Matrize wurde nach der Transkriptionsreaktion durch einen DNase Verdau entfernt.

Als Template für die 520 Nukleotide lange *proBA*-Sonde diente das mit *Xho*I linearisierte Plasmid pFSB66. Für alle weiteren Sonden dienten PCR-Produkte als Matrize, die unter Verwendung von Oligonukleotiden hergestellt wurden von denen das jeweils stromabwärts gelegene Oligonukleotid am 5'Ende mit einer T7-Promotorsequenz versehen war. Der Herstellung der *proHJ*-Sonde diente ein 377 bp PCR-Produkt (*proHJ* Sonde fwd./*proHJ* Sonde rev., Tab. 4) und der Herstellung der *trnB*-Sonde ein 78 bp PCR-Produkt (*trnB*-Ala-T7 for./*trnB*-Ala-Probe, Tab. 4). Die *opuA*-Sonde hatte ein 500 bp PCR-Produkt (*opuAA* for 195/*opuAA* rev 696 T7, Tab. 4), die *opuB*-Sonde ein 572 bp PCR-Produkt (*opuBC* 26 for/*opuBC* 598 T7, Tab. 4), die *opuC*-Sonde ein 502 bp PCR-Produkt (*opuCC* 17 for/*opuCC* 519 rev T7, Tab. 4), die *opuD*-Sonde ein 530 bp PCR-Produkt (*opuD* 277 for/*opuD* 807 rev T7, Tab. 4) und die *opuE*-Sonde ein 483 bp PCR-Produkt (*opuE* 105 for/*opuE* 588 rev T7) als Matrize.

#### 4.4.2 RNA-RNA Hybridisierung (Northern Blot)

Für den Northern-Transfer wurden 1-15 µg RNA (die entsprechende Menge ist im Ergebnisteil angegeben) und 4 µg peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqlab, Erlangen) in 10 mM MOPS pH 7 mit 50 % Formamid und 6,5 % Formaldehyd 5 Minuten bei 70 °C denaturiert und in einem 1,4 %-igen Agarosegel in 10 mM MOPS pH7 für etwa 3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nylon-Membran (Nytran® 0,45; Schleicher&Schuell, Dassel) erfolgte über Nacht (12-16 Stunden) mit 10xSSC (Sambrook *et al.*, 1989). Danach wurde die RNA mit Hilfe von UV-Licht (Stratalinker® 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Markerspur wurde abgeschnitten und die Banden wurden durch Färben in Methylenblau (0,005 % in H<sub>2</sub>O) sichtbar gemacht. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte circa 16 Stunden in 5xSSC, 50 % Formamid, 2% blocking Reagenz (Roche, Mannheim) 7% SDS und 0,1 % Lauroylsarcosin). Anschließend wurde die Membran zwei mal 5 Minuten bei 70°C in 2 X SSC und 0,1 % SDS und zwei mal 15 Minuten bei 70°C in 0,2 x SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Die weiteren Waschschrte erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989). Die Transkripte wurden auf einem Phosphorimager Storm 860 (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0,5 ml ECF-Vista (Amersham Biosciences, Freiburg) als Substrat detektiert. Zur Verarbeitung der Daten, insbesondere zur Quantifizierung der Transkriptmengen, wurde die Image QuANT™-Software von Molecular Dynamics, Inc. verwendet.

#### 4.5 Analyse von mRNA Startpunkten durch Primer Extension

Für die Ermittlung von mRNA-Startpunkten wurde RNA aus Zellen präpariert, die unter den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Bedingungen gezogen wurden. Das verwendete Oligonukleotid (*proHJ* PE2, Tab. 4) war am 5' Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD800 markiert. Für die reverse Transkription wurden in dem Puffer für die AMV reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) 20 µg der entsprechenden RNA mit 2 pmol des Oligonukleotids gemischt, für 3 Minuten auf 75°C erhitzt und der Thermomixer anschließend auf 42°C eingestellt, so dass ein langsames Abkühlen auf diese Temperatur erfolgte. Danach wurde 1 µl dNTP-Mix (8 mM) und 10 Units AMV reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 42 °C inkubiert. Die cDNA wurde mit 96 %-igem Ethanol gefällt und in 6 µl Formamidpuffer (Stop-Lösung des „Thermo Sequenase™ DYEnamic direct cycle sequencing kit mit 7-deaza-GTP“ (Amersham Biosciences, Freiburg)) aufgenommen. Parallel zu der reversen Transkription wurde eine Sequenzreaktion mit demselben Oligonukleotid und pJS13 als Matrize durchgeführt und zur Ermittlung des mRNA-Startpunktes neben der cDNA auf dem LiCOR® DNA-Sequencer (Modell 4000, MWG) analysiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wurden die Reaktionen 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

#### 4.6 Computergestützte Sequenzanalysen

DNA- und Proteinsequenzanalysen wurden unter der Verwendung des Programmpaketes Lasergene (DNA-Star Ltd., London, G.B.) durchgeführt. Vergleiche von Proteinsequenzen erfolgten mit Hilfe des Clustal Algorithmus „MegAlign“ (DNA-Star). Datenbankvergleiche mit veröffentlichten Sequenzen anderer Organismen wurden mit dem BLAST-Programm (Altschul *et al.*, 1990) am NCBI (National center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) durchgeführt. Topologieberechnungen von Proteinen wurden mit Hilfe des Programms TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)) erstellt.

## 4.7 Konstruktion von Plasmiden

In diesem Abschnitt beschriebene Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tabelle 4. Die Nukleotidsequenz wurde über Sequenzierung verifiziert.

**pGH26:** Das Plasmid pGH26 diente als Überexpressionsplasmid für das Substratbindepotein ProX aus *A. fulgidus*. Aufgrund einer für Lipoproteine typischen Signalsequenz ist anzunehmen, dass das native ProX Protein aus *A. fulgidus* aminoterminal mit einem Lipid modifiziert und anschließend in der Membran verankert wird. Um die heterologe Überproduktion von löslichem ProX aus *A. fulgidus* zu ermöglichen wurde das *proX* Gen so amplifiziert, dass das Protein nach der Überproduktion aminoterminal um 18 Aminosäuren verkürzt vorlag. Das *proX* Gen wurde mit den Oligonukleotiden Iba6 *proX* fwd. und Iba6 *proX* rev. aus dem Genom von *A. fulgidus* über PCR amplifiziert. Beide Oligonukleotide führen eine *BsaI* Schnittstelle ein. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit *BsaI* geschnitten und in den mit dem selben Enzym geöffneten Vektor pASKIBA6 ligiert. Das Gen ist damit so in den Vektor inseriert, dass es unter der Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors steht. Das resultierende Protein trägt später aminoterminal eine *ompA*-Signalsequenz, die eine Sekretion des Proteins in das Periplasma bewirkt, und zusätzlich ebenfalls aminoterminal einen Strep-Affinitätstag und eine Faktor Xa Schnittstelle.

**pGH22:** Unter Verwendung der Oligonukleotide *proU* fwd. *NdeI* (führt eine *NdeI*-Schnittstelle ein) und *proU* rev. *BamHI* (führt eine *BamHI*-Schnittstelle ein) wurde das gesamte *proU* Gencluster aus dem Genom von *A. fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit *NdeI* und *BamHI* restringiert und in den Vektor pJoe2702 ligiert, der mit den selben Enzymen restringiert worden war. Das Gencluster wurde in dem Plasmid unter die Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors gestellt.

## 5. Biochemische Methoden

### 5.1 Heterologe Überexpression und Reinigung von ProX aus *A. fulgidus*

#### 5.1.1 Heterologe Überexpression von ProX

Das Plasmid pGH26 wurde in BL21 Codon Plus<sup>®</sup> RIL-Zellen transformiert. Diese Zellen enthalten ein Plasmid, das für seltene transfer-RNAs von Arginin, Isoleucin und Leucin codiert, was eine effektive Überproduktion von Proteinen aus AT-reichen Organismen ermöglicht. Für die Überproduktion von ProX wurden 4 l MMA mit 150 µg l<sup>-1</sup> Ampicillin und 30 µg l<sup>-1</sup> Chloramphenicol aus einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> zwischen 0,5 und 0,8 inkubiert. Die Überexpression von ProX wurde durch die Zugabe von 0,2 mg l<sup>-1</sup> Anhydrotetracyclin induziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

#### 5.1.2 Metabolisches Labeling von ProX mit Selenomethionin

Um das Phasenproblem bei der Bestimmung der Kristallstruktur von ProX lösen zu können, wurde das Protein mit Selenomethionin markiert. Dabei wurde die Methode der metabolischen Inhibition angewendet (Doublié, 1997; Van Duyne *et al.*, 1993). Diese Methode beruht darauf, dass die Methioninsynthese in *E. coli* reprimiert wird, wenn den

Zellen extern große Mengen von L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Threonin, L-Isoleucin; L-Leucin und L-Valin zur Verfügung stehen. Unter diesen Bedingungen nutzen die Zellen extern zugegebenes Selenomethionin, um es in neu zu synthetisierende Proteine einzubauen. Als Überexpressionswirt dienten auch hier BL21 Codon Plus<sup>®</sup> RIL-Zellen, die mit dem Plasmid pGH26 transformiert worden waren. Die Zellen wurden über Nacht in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert und anschließend wurden 16 ml dieser Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in M9-Medium resuspendiert und zum Animpfen von 4 l M9 Medium mit den entsprechenden Antibiotika verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 bei 37°C aerob inkubiert (die Wachstumsrate ist ca. 3-5 mal geringer als in MMA-Medium). Zu diesem Zeitpunkt wurden pro Liter 100 mg L-Lysin, 100 mg L-Phenylalanin, 100 mg L-Threonin, 50 mg L-Isoleucin, 50 mg L-Leucin, 50 mg L-Valin und 50 mg L-Selenomethionin (Acros Organics, bezogen über Fisher Scientific, Schwerte) als Pulver zugegeben. 15 Minuten nach der Zugabe der Aminosäuren wurde die Überproduktion von ProX durch die Zugabe von 0,2 mg l<sup>-1</sup> Anhydrotetracyclin induziert und die Zellen wurden 6 Stunden später geerntet.

### 5.1.3 Periplasmatischer Aufschluss von *E. coli* und Reinigung von ProX

Um einen periplasmatischen Extrakt von *E. coli* zu gewinnen wurden die Zellpellets in 1/100 des Kulturvolumens Puffer P (100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und unter gelegentlichem vortexen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei wird die äußere Membran von *E. coli* durch die hohe Osmolarität und das Vorhandensein von EDTA permeabilisiert und die im Periplasma befindlichen Proteine werden freigesetzt. Anschließend wurden die Sphaeroplasten durch eine Grobzentrifugation (15 Minuten bei 20000 g) abgetrennt und der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (30 Minuten bei 120000 g) unterzogen, um Membrantrümmer zu entfernen. ProX befand sich nach diesem Zentrifugationsschritt in der löslichen Fraktion. Der Zellextrakt wurde auf eine Strep-Tactin Affinitätssäule (Ø1 cm, Höhe 10 cm) (IBA, Göttingen), die mit Puffer W (100 mM Tris/HCl pH8) equilibriert war, aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Volumen Puffer W gewaschen und ProX wurde danach mit Puffer E (100 mM Tris/HCl pH 8, 2,5 mM Desthiobiotin) von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (Abschnitt 5.6) analysiert und die ProX-haltigen Fraktionen wurden vereinigt. Da die *ompA*-Signalsequenz bei der Überproduktion nicht komplett von *E. coli* abgespalten wurde und da der Affinitäts-Tag ebenfalls entfernt werden sollte, wurden diese Elemente über Nacht bei Raumtemperatur mit Faktor Xa abgespalten. Zu diesem Zweck wurden die ProX haltigen Fraktionen mit 100 mM NaCl und 1 mM CaCl<sub>2</sub> versehen. Pro 200 µg Protein wurden 1 µg Faktor Xa zugegeben.

Um den Faktor Xa und andere kontaminierende Proteine zu entfernen wurde das Protein einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Das mit Faktor Xa behandelte ProX wurde 1:2 mit deionisiertem Wasser verdünnt und auf eine UnoQ 6-Säule (BioRad, München) geladen, die vorher mit Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8) equilibriert worden war. Das Protein wurde durch einen ansteigenden NaCl Gradienten zwischen Puffer A und Puffer B (50 mM Tris/HCl pH8, 1 M NaCl) von der Säule eluiert: 20 ml 0 % Puffer B, 80 ml linearer Gradient bis 40 % Puffer B, 20 ml 100 % Puffer B. ProX eluierte bei einer NaCl Konzentration von circa 250 mM und Analysen über SDS-PAGE zeigten, dass es zur apparenten Homogenität gereinigt war. Sollte das Protein zur Kristallisationsexperimenten weiterverwendet werden wurde es über Vivaspin 20 Konzentratoren (Vivascience, Hannover) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf eine Konzentration von 10 mg/ml ankonzentriert. Zur Verwendung des Proteins für Bindestudien im Fluoreszenzspektrometer oder mit radioaktiv markiertem Glycin Betain wurde ProX über Nacht gegen 5 Liter 10 mM Tris pH 7,5 dialysiert.

Die Reinigung von Selenomethionin markiertem ProX erfolgte auf die gleiche Weise, wobei das Protein die gleichen chromatographischen Eigenschaften zeigte, wie unmarkiertes ProX. Um den Einbau von Selenomethionin zu überprüfen, wurde das gelabelte Protein massenspektrometrisch im MALDI-Tof untersucht. Als Referenz diente nicht markiertes ProX.

## **5.2 Herstellung eines Antiserums gegen das heterolog produzierte ProX**

Für die Herstellung eines Antiserums wurde ProX gereinigt, über Nacht gegen 5 l Phosphat gepufferte Saline (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH7, 0,9 % NaCl) dialysiert und anschließend auf 1 mg ml<sup>-1</sup> ankonzentriert. 1 ml dieser Lösung wurde mit 1 ml AdjuPrime Suspension (Pierce, Rockford, IL, USA) (10 mg ml<sup>-1</sup>) gemischt und in 200 µl Aliquots eingefroren. Ein Hase wurde in einem Zeitraum von drei Monaten acht mal mit dieser Suspension injiziert und sieben Tage nach der letzten Injektion geschlachtet. Das Serum wurde vom Blutkuchen getrennt und konnte 1:10000 verdünnt in Westernblots eingesetzt werden.

## **5.3 Bindestudien mit dem heterolog produzierten ProX**

### **5.3.1 Bindestudien mit radioaktiv markiertem Glycin Betain**

Um etwas über die Bindeeigenschaften des gereinigten Bindeproteins ProX aus *A. fulgidus* herauszufinden, wurden Bindestudien mit radioaktiv markiertem [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain durchgeführt. Dabei wurde die Ammoniumsulfat-Präzipitationsmethode nach Richarme und Kepes (Richarme & Kepes, 1983) angewendet. Zu diesem Zweck wurden 5 µM ProX 5 Minuten bei den im Ergebnisteil angegebenen Temperaturen mit 5 µM radioaktiv markiertem Glycin Betain inkubiert und anschließend durch die Zugabe von eiskaltem gesättigten Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Suspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend auf Nitrocellulosefilter (Porengröße 0,45 µM, Schleicher & Schuell, Dassel) gesaugt und mit gesättigtem Ammoniumsulfat gewaschen. Die Filter wurden in 20 ml Szintillationsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (QuicksafeA, Zinsser Analytic) überschichtet. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900CA) bestimmt. Sollte die Substratspezifität von ProX bestimmt werden, wurden 5 µM ProX mit 5 µM radioaktiv markiertem Glycin Betain und einem 40-400 fachen Überschuss verschiedener nicht markierter kompatibler Solute 5 Minuten bei 85°C inkubiert, mit Ammoniumsulfat gefällt und nach 5 Minuten Inkubation auf Eis auf Nitrocellulosefilter gesaugt. Diese Filter wurden ebenfalls gewaschen und die verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt.

### **5.3.2 Bestimmung der Affinitätskonstanten (K<sub>D</sub>) durch Fluoreszenzspektroskopie**

Die Fluoreszenz eines Proteins ist abhängig von der Anzahl und der Orientierung (bzw. Umgebung) der im Protein befindlichen aromatischen Aminosäuren. Dabei hat Tryptophan bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm den größten Anteil an der Fluoreszenz. Ändert sich die Umgebung eines Tryptophans durch Bewegung des Proteins (z.B. bei der Substratbindung), kommt es zu einer Änderung der Fluoreszenz (die Intensität ändert sich und/oder das Maximum kann sich verschieben). Die Bindung von Glycin Betain bzw. Prolin Betain durch ProX führt zu einer Steigerung der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins bei

einer Anregungswellenlänge von 280 nm. Diese Eigenschaft nutzten wir, um die Affinitätskonstanten des Proteins für seine beiden Substrate zu ermitteln. Alle Spektren wurden mit einem Cary Eclipse Spektralphotometer (VARIAN, Darmstadt) bei Raumtemperatur aufgenommen. Es wurden Emissionsspektren bei 280 nm Anregungswellenlänge von 290 nm bis 450 nm aufgenommen. Die Messungen erfolgten in 1 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5. 50 µg ProX wurden zu dem Puffer gegeben und die Lösung wurde gemischt. Danach wurde das erste Emissionsspektrum aufgezeichnet. Anschließend wurde das Protein titriert, indem schrittweise 5 µl Substrat aus einer 40 µM Glycin Betain- bzw. Prolin Betain-Stammlösung zugegeben wurde und jeweils nach einer Minute die Veränderung der Fluoreszenz im Emissionsspektrum gemessen wurde. Die Integrale der Emissionsspektren wurden berechnet, für die Verdünnung korrigiert und die Änderung der Fluoreszenz wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die  $K_D$  wurde durch Fitten der Daten auf folgende Gleichung erhalten:

$$F = F_0 + (\Delta F / 2P_0) [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4L_0P_0)^{1/2}]$$

Dabei ist F die gemessene Fluoreszenz,  $F_0$  die Fluoreszenz des freien Proteins,  $\Delta F$  die Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung und  $P_0$  und  $L_0$  die Gesamtkonzentration des Proteins bzw. der Substrate.

#### 5.4 Herstellung von Rohextrakten aus *A. fulgidus* und *E. coli*

Für die Herstellung von zellfreien Extrakten aus *A. fulgidus* und *E. coli* wurden die Zellen bis zur gewünschten optischen Dichte kultiviert, durch Zentrifugation geerntet und in 1/100 des Kulturvolumens Puffer W (Abschnitt 5.1) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Ultraschall mit einer Ausgangsleistung von 200 W aufgeschlossen. Die Kontrolle des Zellaufschlusses erfolgte mikroskopisch. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15 Minuten bei 21000 g) und die Extrakte wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 5.5 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau R250 in Lösung von 465 nm auf 595 nm durch Bindung von Protein im sauren. Die Bestimmung erfolgte mit dem BioRad Microassay (BioRad, München) mit Rinder-Serumalbumin als Standard. Dazu wurden 0,8 ml Probe oder Standard (0-20 µg) mit 0,2 ml BioRad-Reagenz versetzt, und die Absorption der Lösung bei 595 nm nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt.

#### 5.6 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenbestimmung von Proteinen und zur Reinheitskontrolle des gereinigten ProX Proteins wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Die Gele wurden nach den Angaben in Tabelle 9 gefertigt. Die Gelelektrophorese wurde in einer BioRad Elektrophorese Apparatur (Mini Protean II) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in Probenpuffer (240 mM Tris/HCl, pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 10 mM DTT; 0,0004% Bromphenolblau) aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend direkt auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 35 mA



in Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)). Als Größenstandard diente der Dalton Marker VII (Sigma, Deisenhofen).

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele 15 Minuten in einer Lösung, die aus 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10, (v/v/v)) bestand, bei ca. 80°C inkubiert. Das Entfernen von nicht gebundenem Farbstoff erfolgte anschließend in einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/Eisessig (81:12:7, (v/v/v)).

**Tabelle 9:** Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele

Benötigte Lösungen	Zusammensetzung
<b>Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (Roth)</b>	30 % Stammlösung, Verhältnis 37,5:1
<b>Trenngel</b>	15 %-ig: 5 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1 % SDS; 2,5 ml H <sub>2</sub> O; 20 µl Temed <sup>a</sup> (Roth), 50 µl 10 % APS <sup>b</sup>
<b>Sammelgel</b>	3 %-ig: 1 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1%SDS, 6,5 ml H <sub>2</sub> O, 20 µl Temed <sup>a</sup> (Roth), 50 µl 10 % APS <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: Ammoniumperoxidisulfat. <sup>b</sup>: N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

## 5.7 Immunodetektion von Proteinen (Western-blot Analyse)

### 5.7.1 Transfer von Proteinen auf Membranen

Für die Immunodetektion von ProX in *A. fulgidus* Zellextrakten wurden pro Spur eines 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgels 30 µg Zellextrakt von Zellen, die bei den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Bedingungen gezogen wurden, aufgetrennt. Als Größenstandard diente der „Prestained Protein Marker Broad Range“ von NEB (Schwalbach). Die Proteine wurden anschließend in einer Mini-Blot Apparatur (BioRad, München) in Blot-Puffer (100 mM Tris-Glycin (pH7,5); 100 mM NaCl; 20% Methanol) bei 100 V für eine Stunde auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen (Towbin *et al.*, 1979).

### 5.7.2 Detektion von ProX mit einem spezifischen Antiserum

Die mit Protein beladenen PVDF-Membranen wurden zunächst über Nacht in TBST-Lösung (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 (v/v)) mit 5 % Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit ProX-spezifischen Antikörper aus Hase (Abschnitt 5.3) in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST mit 5 % Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran drei mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein alkalische Phosphatase-konjugierter goat anti rabbit-Antikörper (Sigma, Deisenhofen), der 1:8000 in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt wurde. Nach einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zwei mal für 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) equilibriert. Die Detektion erfolgte mit ECF-Vista (Amersham Biosciences, Freiburg) als Substrat auf einem Storm 860 Phosphorimager (Amersham Biosciences, Freiburg). Zur Quantifizierung der detektierten Proteinmengen, wurde die Image QuaNT<sup>TM</sup>-Software von Molecular Dynamics, Inc. verwendet.

Um den Anteil von ProX am Gesamtprotein von *A. fulgidus* zu bestimmen, wurden quantitative Westernblots durchgeführt. Dazu wurden jeweils angegebene Mengen des

gereinigten ProX neben unterschiedlichen Mengen Gesamtzellextrakt aus *A. fulgidus* auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einem ProX spezifischen Antikörper detektiert. Die Signalintensitäten des gereinigten ProX wurden quantifiziert und als Eichreihe verwendet. Mit Hilfe dieser Eichreihe ließ sich nun aus den Signalintensitäten des ProX-Signals aus den Gesamtzellextrakten der Anteil von ProX am Gesamtprotein von *A. fulgidus* errechnen.

### 5.7.3 MALDI-Tof Massenspektrometrie

Um die molekulare Masse von gereinigtem ProX und mit Selenomethionin markiertem gereinigten ProX zu bestimmen, wurden massenspektrometrische Analysen mittels MALDI-Tof durchgeführt. Dabei wurden Proteinlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 µM-1 µM) mit einer gesättigten Sinapinsäurelösung (in 0,1 % Trifluoressigsäure, 67 % Acetonitril) 1:1 gemischt, auf einen Probenträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die anschließende Messung der Proben erfolgte in einem PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup>RP Spectrometer (Applied Biosystems, Langen). Die Geräteparameter wurden wie folgt gewählt: Beschleunigungsspannung 25000 V, Gitterspannung 23000 V, Verzögerung 300 nsec und eine Laserstärke von 50 %. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die vom Hersteller mitgelieferte Software.

## 5.8 Messung der Aufnahme [<sup>14</sup>C]-markierter Verbindungen

### 5.8.1 Bestimmung der Transportrate von <sup>14</sup>C-Glycin Betain und <sup>14</sup>C-Glutamat

Für die Bestimmung der Aufnahme von Glycin Betain wurde [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol), für die Bestimmung der Aufnahme von Glutamat wurde [1-<sup>14</sup>C]-Glutamat (spezifische Aktivität: 45 mCi/mmol) verwendet. *E. coli* bzw. *B. subtilis* Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium gezogen und zum Inokulieren von 20 ml Minimalmedium auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 verwendet. Die Zellen wurden unter den jeweils angegebenen Bedingungen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> 0,5-0,8) inkubiert. Zur Messung der Transportrate wurden 2 ml Kultur entnommen, die OD<sub>578</sub> bestimmt und der Kultur wurde radioaktiv markiertes Glycin Betain bzw. Glutamat in den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Zellen wurden bei der entsprechenden Wachstumstemperatur in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) unter Schütteln weiter inkubiert und in definierten Zeitabständen (20-100 Sekunden) wurden jeweils 300 µl Kultur entnommen und auf Nitrocellulosefilter (0,45 µm, Schleicher&Schuell, Dassel) gesaugt. Es wurde mit isotonischem Medium nachgespült, die Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (QuicksafeA, Zinsser Analytic) überschichtet. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Packard, Liquid Szintillation Analyser 190CA) bestimmt. Als Referenz für die eingesetzte Menge an Radioaktivität dienten 300 µl ungefilterte Kultur. Die erhaltenen dpm wurden nach der unten angegebenen Formel in nmol aufgenommenes Substrat pro mg Protein umgerechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD<sub>578</sub> einer Bakteriensuspension von 1 einem Proteingehalt von 0,1 mg ml<sup>-1</sup> entspricht (Miller, 1992).

$$\frac{\text{nmol radioaktiv markierte Verbindung}}{\text{mg Protein}} = \frac{\text{dpm in 0,3 ml} \cdot \text{nmol markierte Verbindung in 0,3 ml}}{\text{OD}_{578} \cdot 0,03 \text{ mg Protein} \cdot \text{dpm der Referenz in 0,3 ml}}$$

### 5.8.2 Messung des Glutamat- bzw. Glycin Betain-Pools

Für die Bestimmung des Glutamat- bzw. Glycin Betain-Pools unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurden *B. subtilis* Zellen in 5 ml Minimalmedium mit 1 mM radioaktiv markiertem Glycin Betain bzw. Glutamat (2% markiertes und 98% unmarkiertes Glycin Betain bzw. Glutamat) auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 angeimpft und unter den im Ergebnisteil angegebenen Bedingungen bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden 300 µl der Zellsuspension entnommen und auf Nitrocellulosefilter (0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) gesaugt. Die Filter wurden mit isotonischem Medium gespült und die verbleibende Radioaktivität wurde wie unter 5.8.1 beschrieben in einem Szintillationszähler bestimmt. Die erhaltenen dpm wurden wie unter 5.8.1 beschrieben in nmol aufgenommenes Substrat pro mg Zellprotein umgerechnet und mit Hilfe des ermittelten Zellvolumens von *B. subtilis* von 6,7 µl pro mg Zellprotein (Moses, 1999) wurde die Konzentration der aufgenommenen Verbindungen in den Zellen berechnet.

## 5.9 Analyse von Zellextrakten mit <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie

Zum Nachweis dominanter organischer Verbindungen in ethanolischen Zellextrakten von *B. subtilis* wurden <sup>13</sup>C-NMR-Spektren (nuclear magnetic resonance) aufgenommen. Dazu wurden 600 ml SMM (verteilt auf zwei 2l Erlenmeyer-Kolben) mit exponentiell wachsenden (OD<sub>578</sub> 0,5-1) *B. subtilis*-Zellen auf eine optische Dichte von 0,1 inokuliert, innerhalb von 15 Minuten auf 52°C erhitzt und bei dieser Temperatur unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und einmal mit isotonischem Medium ohne Glucose und Aminosäurezusätze gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 20 ml 80 %-igem Ethanol resuspendiert und die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis unter Rühren inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer durch eine 15 minütige Zentrifugation (21000 g) entfernt und der Überstand wurde in einem Rotationsverdampfer (Roth, Karlsruhe) eingedampft. Restliche Flüssigkeit wurde durch Lyophilisieren einem Christ Alpha 1-4-Lyophilisator (B. Braun Biotech, Melsungen) entfernt. Der getrocknete Extrakt wurde in 0,5 ml D<sub>2</sub>O (Fluka) und 0,5 ml D<sub>2</sub>O mit 0,75 % TSP (D<sub>4</sub>-3-Trimethylsilyl-Propionat) als internem Standard (Aldrich, Deisenhofen) aufgenommen. Die [<sup>13</sup>C]-Kernresonanzspektren wurden in einem Bruker AC400 Spektrometer breitbandentkoppelt aufgenommen (Nau-Wagner *et al.*, 1999). Zum Vergleich wurden Spektren von 100 mM Glutamat und Prolin in D<sub>2</sub>O mit TSP als internem Standard aufgenommen. Die Lage der Resonanzen wurde jeweils relativ zur Resonanz des internen Standards bestimmt.

## 5.10 HPLC-Analysen von Aminosäuren aus *B. subtilis* Zellextrakten

Bei allen für die HPLC Analysen verwendeten Chemikalien und Lösungen handelte es sich um chromatographiereine Produkte (HPLC-Gradient oder HPLC-Ultra Grade) der Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Deisenhofen), J.T. Baker (Phillipsburg, Nj, USA) oder Merck (Darmstadt).

### 5.10.1 Zellzucht und Mikroextraktion nach Bligh und Dyer

Für HPLC-Analysen wurden *B. subtilis* Zellen in Minimalmedium unter den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Bedingungen bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1-2 gezogen. 20-40 ml dieser Kulturen wurde anschließend bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und die Zellpellets wurden direkt in Trockeneis/Ethanol schockgefroren und bis zur Verwendung bei

–80°C aufbewahrt. Kulturen die bei 52°C gezogen wurden, wurden bei Raumtemperatur geerntet.

Die Extraktion der Aminosäuren erfolgte mittels einer nach Bligh und Dyer (Bligh, 1959; Kunte *et al.*, 1993) modifizierten Methode zur Extraktion kompatibler Solute. Diese Methode dient dazu, die Membranen ganzer Zellen aufzulösen und die Inhaltsstoffe freizusetzen. Die Zellpellets wurden zu diesem Zweck zunächst über Nacht in einem Christ Alpha 1-4-Lyophilisator (B. Braun Biotech, Melsungen) gefriergetrocknet und die Zelltrockenmasse wurde bestimmt. Die getrockneten Zellen wurden dann in 500 µl Methanol/Chloroform/Wasser 10:5:4 (v/v/v) aufgenommen und zunächst für 30 Minuten in einem Ultraschallbad und anschließend für 30 Minuten auf einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur homogenisiert. Danach wurden gleiche Mengen (jeweils 130 µl) Chloroform und Wasser zugegeben und die Suspension wurde weitere 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (30 Minuten bei 21000 g) wurde die Methanol/Wasser-Phase (450 µl) abgenommen und bei 50°C über Nacht eingetrocknet. Der Extrakt wurde in 200 µl Wasser aufgenommen und vor der Messung mit Wasser zu geeigneten Konzentrationen verdünnt.

### 5.10.2 Vorsäulenderivatisierung mit FMOC

Die Proben und Standards (Prolin und Glutamat Lösungen in Konzentrationen von 10-250 µM) wurden mit Hilfe einer veränderten Vorsäulenderivatisierungsmethode (Grom, Applikationsservice) unter Verwendung des fluoreszierenden 9-Fluorenyloxycarbonyl-chlorid (FMOC, Grom, Rottenburg-Hailfingen) derivatisiert. FMOC reagiert schnell sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminen und bildet intensiv fluoreszierende bei Raumtemperatur über 30 Stunden stabile Derivate. FMOC wird im Überschuss zugesetzt, um eine quantitative Umsetzung der Aminosäuren zu erzielen. Da jedoch FMOC selbst und der durch Hydrolyse und Decarboxylierung entstehende Fluorenylalkohol (FMOC-OH) gleichzeitig mit einigen derivatisierten Aminosäuren von der Säule eluieren und eine Auswertung des Chromatogramms damit erschweren, muss der Überschuss entfernt werden. In einem zweiten Schritt wird FMOC durch die Zugabe von ADAM umgesetzt. Dieses Derivat ist hydrophober als die Derivate der zu analysierenden Aminosäuren und eluiert daher am Ende des Programms.

Bei der Derivatisierung wurden 40 µl interner Standard (50 µM Taurin (Merck, Darmstadt) in 0,5 M Borat-Puffer (pH7,7)), 40 µl Probe oder Standard und 80 µl FMOC zusammengegeben und mindestens 45 Sekunden intensiv gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl ADAM (40 mM in 0,5 M Boratpuffer pH7,7/Aceton 1:1 (v/v)) und es wurde erneut wenigstens 45 Sekunden gemischt. Der Reaktionsansatz wurde dann mit 140 µl Puffer A (20% Acetonitril und 0,5 % Tetrahydrofuran in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6)) versetzt.

### 5.10.3 HPLC Analyse

Die verwendete HPLC war von der Firma SYKAM (Fürstfeldbruck) und bestand aus Autosampler (S5200), Säulenofen (S4011), Pumpensystem (S1121), „Low pressure gradient“-Mixer (S8111) und Vakuumdegaser (S7505). Als Trennsäule diente eine LiChroCart®-Kartusche (Grom, Rottenburg-Hailfingen) von 125 mm Länge und 4 mm Durchmesser, die mit der reversed phase-Matrix Supersphere 60 RP-8 mit einer Partikelgröße von 4 µm (Merck, Darmstadt) gepackt war. Die Vorsäule hatte eine Größe von 10 x 4 mm und war mit demselben Säulenmaterial gefüllt. Das für die Aminosäureanalyse verwendete Laufmittelsystem bestand aus Puffer A (s. Abschnitt 5.10.2) und Puffer B (80% Acetonitril in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4,6).

Mit Hilfe des Autosamplers wurden 10 µl der derivatisierten Proben auf die Säule aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 1,25 ml min<sup>-1</sup> bei 45°C unter Verwendung des in Tabelle 10 angegebenen Gradienten. Die Detektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzdetektors Jasco 821 FP (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm und einer Emissionswellenlänge von 316 nm. Aufzeichnung, Identifizierung und Quantifizierung der Detektorsignale erfolgte unter Verwendung der Analysesoftware Pyramid 2000 (Axxiom, California, USA). Die Zuordnung und Quantifizierung der Signale erfolgte durch die Messung verschiedener Standards, die unterschiedliche Mengen Prolin und Glutamat enthielten. Zur Auswertung einer Messreihe wurden mindestens 5 verschiedene Standards gemessen, die im Abstand von maximal 5 zu analysierenden Proben gemessen wurden.

**Tab. 10:** Gradient für die Auftrennung FMOC-derivatisierter Aminosäuren

<b>Zeit</b>	<b>% PufferA</b>	<b>%PufferB</b>
0	100	0
15	91	9
30	70	30
40	40	60
42	0	100
47	0	100
49	100	0
55	100	0

## IV ERGEBNISSE

### 1. Biochemische und physiologische Charakterisierung des ProU-Transporters aus *Archaeoglobus fulgidus*

Hochaffine Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter wurden ursprünglich in Gram-negativen Bacteria entdeckt (Ames, 1986). Sie bestehen aus einem hochaffinen extrazellulären Substratbindeprotein, zwei Transmembrankomponenten und einer cytoplasmatischen Untereinheit, welche die Energie für den Transport von Substraten durch ATP-Hydrolyse generiert. Diese ABC-Transporter sind in Eukarya, Bacteria und Archaea verbreitet und dienen der Aufnahme unterschiedlichster Substrate. Unter anderem werden ABC-Transporter auch für die Akkumulation kompatibler Solute genutzt. Solche ABC-Transporter aus Bacteria sind schon vor längerer Zeit identifiziert und charakterisiert worden, aber kürzlich wurde auch in methanogenen Archaea ein ABC-Transporter für die Aufnahme von Glycin Betain charakterisiert (Roessler *et al.*, 2002). Auch im Genom des hyperthermophilen Archaeons *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) findet sich ein Gencluster (*proU*), das deutliche Homologien zu ABC-Transportern für kompatible Solute anderer Archaea und Bacteria aufweist.

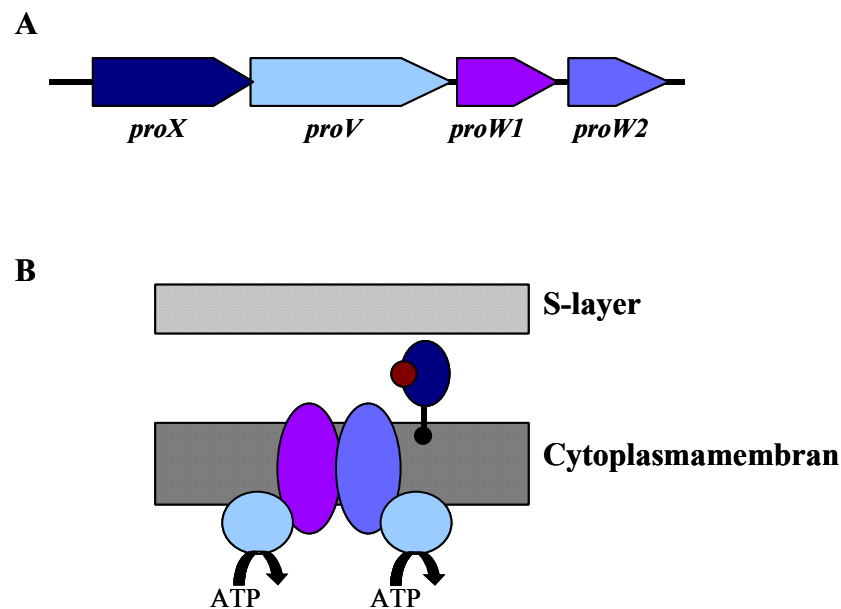
#### 1.1 Charakterisierung des ProU Transporters

##### 1.1.1 Analyse der offenen Leserahmen des *proU*-Genclusters

Das *proU* Gencluster besteht aus den Genen *proX*, *proV*, *proW2* und *proW1*, die auf dem Chromosom von *A. fulgidus* hintereinander angeordnet sind (Abb. 4A). Der Transporter ProU setzt sich damit aus dem putativen Substratbindeprotein ProX, der ATPase ProV und den putativen Transmembranproteinen ProW1 und ProW2 zusammen (Abb. 4B).

Datenbankanalysen (Altschul *et al.*, 1990) ergaben, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz des *proX*-Gens deutliche Übereinstimmungen mit dem Substratbindeprotein OtaC des Glycin Betain-Aufnahmesystems Ota aus *Methanosarcina mazei* Gö1 zeigt. Auf Proteinebene besteht eine Sequenzidentität von 55%. Zudem finden sich signifikante Ähnlichkeiten zu weiteren putativen Glycin Betain-Bindeproteinen verschiedener Bakterien und zu dem Bindeprotein (OpuCC) des OpuC-Transporters aus *B. subtilis* (Sequenzidentität 32%). ProX ist ein

hydrophiles Protein mit einer molekularen Masse von 33 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 4,6. Am Aminotermius findet sich, wie bei den Substratbindeproteinen Gram-positiver Bakterien, eine Sequenz, welche die typischen Charakteristika einer Signalsequenz aufweist. Diese Signalsequenzen sind kennzeichnend für extracytoplasmatische Proteine und sorgen für ihren effizienten Membrandurchgang. Typisch für eine derartige Signalsequenz ist das Vorkommen von zwei positiv geladenen Aminosäureresten (im Fall von ProX Arginin und Lysin) innerhalb der ersten 5 Aminosäuren, die von 7-12 hydrophoben Aminosäuren gefolgt werden. Am Carboxyterminus der putativen Signalsequenz von ProX findet sich eine Folge von Aminosäuren (Leu-Ala-Ala-Cys), die kennzeichnend für Lipoproteine ist (Braun & Wu, 1994; Fekkes & Driessen, 1999). Diese Sequenz (Konsensus LXSC, wobei L eine Aminosäure mit langer hydrophober Seitenkette, X eine beliebige Aminosäure, S eine Aminosäure mit kurzer neutraler Seitenkette und C ein Cystein ist) wird in Bacteria von der Signalpeptidase II erkannt und üblicherweise vor dem Cystein gespalten. Dieses Cystein wird bei der Reifung des Lipoproteins durch das Anhängen von Fettsäureestern modifiziert, die dann zur Verankerung des Proteins in der Membran dienen (Hayashi & Wu, 1990; Sankaran & Wu, 1993).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des ProU Transporters und Organisation der Gene**

(A) Lage und Orientierung der vier Strukturgene des *proU*-Genclusters. (B) Der ProU-Transporter besteht als Mitglied der Familie Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter aus dem extrazellulären Substratbindeprotein ProX, zwei Transmembrankomponenten (ProW1 und ProW2) und der cytoplasmatischen ATPase ProV.

ProV zeigt auf Proteinebene deutliche Identitäten zu einer Reihe ATP-bindender Proteine aus Prokaryoten und Eukaryoten. Dabei ist die ATP hydrolysierende Untereinheit OtaA des Ota-Transporters aus *M. mazei* mit einer Sequenzidentität von 53% am ähnlichsten zu ProV. Bei ProV handelt es sich ebenfalls um ein hydrophiles Protein und es weist eine molekulare Masse von 41 kDa auf. In der Aminosäuresequenz findet sich ein Walker-Motiv (Walker *et al.*, 1982), was darauf hindeutet, dass es in der Lage ist, ATP zu binden.

ProW1 und ProW2 sind hydrophobe Proteine mit einer molekularen Masse von 21 kDa bzw. 23 kDa und sind vermutlich in der Membran lokalisiert. Beide Proteine zeigen deutliche Homologien zu dem Transmembranprotein OtaB des Ota-Transporters aus *M. mazei*, dabei ist ProW1 zu 58 % identisch und ProW2 zu 47 %. Zudem weisen neben weiteren Transmembrankomponenten putativer Aufnahmesysteme für kompatible Solute auch die Membrankomponenten OpuCB (Sequenzidentitäten 34 % bzw. 27 %) und OpuCD (Sequenzidentität 33 % bzw. 30 %) des OpuC Transporters aus *B. subtilis* signifikante Sequenzidentitäten zu ProW1 und ProW2 auf. ProW1 und ProW2 des ProU Transporters gleichen sich untereinander zu 31 %. Topologische Berechnungen, die mit Hilfe des TMHMM-Programms [[www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)] erstellt wurden, sagen für beide Proteine fünf Transmembranhelices voraus, was sie von der Membrankomponente des Ota-Transporters unterscheidet, für die sechs Membrandurchgänge berechnet wurden.

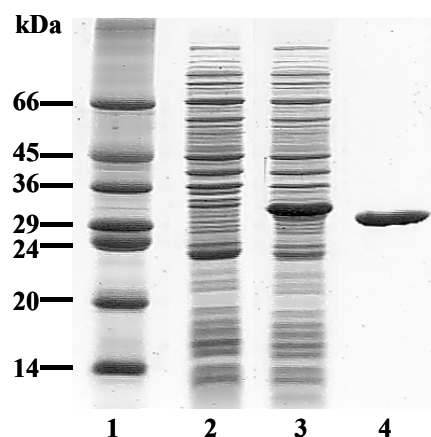
Die signifikante Sequenzidentität zwischen den einzelnen Untereinheiten des Ota-Transporters aus *M. mazei* und des ProU-Transporter aus *A. fulgidus* legt nahe, dass ProU ebenfalls als ABC-Transporter für kompatible Solute fungiert.

### 1.1.2 Heterologe Überproduktion und Reinigung von ProX aus *A. fulgidus*

Um genauere Hinweise auf die Substratspezifität des ProU Transporters zu erhalten, wurde das Substratbindeprotein ProX heterolog in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Es ist wahrscheinlich, dass ProX am Cysteinrest 18 acyliert wird und dadurch in der Membran verankert wird. Um bei der heterologen Überexpression lösliches ProX zu erhalten, wurde das *proX* Gen so amplifiziert und in den Vektor pASKIBA 6 ligiert, dass das überproduzierte Protein aminoterminal um die putative Signalsequenz (17 Aminosäuren) verkürzt vorlag und der Cysteinrest durch einen Glycinrest ersetzt wurde. Das *proX*-Gen wurde in diesem Vektor (pGH26) unter der Kontrolle des Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors exprimiert. Das resultierende Protein war aminoterminal mit einer *ompA*-Signalsequenz, die eine



Sekretion des Proteins in das Periplasma bewirkt und einem Strep-Affinitätstag fusioniert. Beide Elemente können durch eine Abspaltung mit Faktor Xa vom Protein entfernt werden. Das Plasmid pGH26 wurde in den Expressionswirt BL21 (DE3) Codon Plus RIL<sup>®</sup> transformiert, der auf einem Plasmid seltene tRNAs für Arginin, Isoleucin und Leucin codiert, die von *A. fulgidus* genutzt werden. Damit wird in einem heterologen Expressionswirt eine deutlich effizientere Überproduktion von Proteinen aus *A. fulgidus* ermöglicht als in Abwesenheit dieser tRNAs. Das Protein wurde in Minimalmedium ohne Substrate für ProX überproduziert und aus dem periplasmatischen Extrakt gereinigt. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie an einer Strep-Tactin Matrix, anschließende Abspaltung der *ompA*-Signalsequenz und des Strep-Tag mit Faktor Xa und Anionenaustauschchromatographie an UnoQ. Die Reinigung lieferte ein Protein von etwa 31 kDa, das apparente Homogenität aufwies (Abb. 5). Messungen mit Hilfe von MALDI-Tof ergaben ebenfalls eine Masse von 31 kDa, was exakt der berechneten Masse des um 17 Aminosäuren verkürzten ProX entspricht. Pro Liter Kultur wurden circa 5 mg reines ProX erhalten.



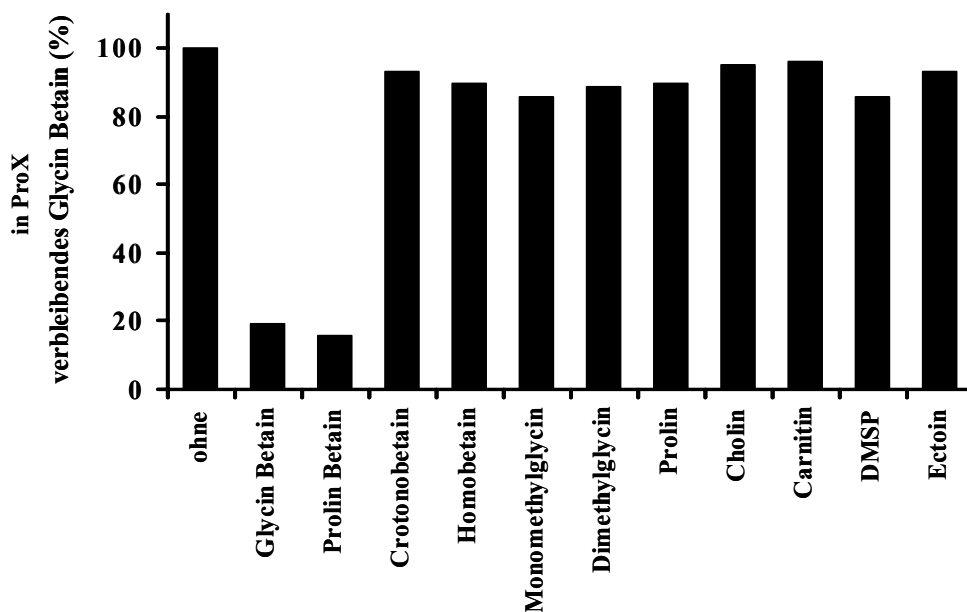
**Abb. 5: Überproduktion und Reinigung von ProX**

ProX wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus<sup>®</sup> RIL Zellen überproduziert und aus dem periplasmatischen Extrakt der Zellen mit Hilfe von Affinitätschromatographie, Spaltung mit Faktor Xa und anschließende Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Spur 1 zeigt den verwendeten Größenstandard, Spur 2 Rohextrakt uninduzierter *E. coli* Zellen, Spur 3 Rohextrakt induzierter *E. coli*-Zellen und in Spur 4 wurden 5 µg des gereinigten Proteins nach Anionenaustauschchromatographie aufgetragen.

### 1.1.3 Bestimmung der Substratspezifität von ProX

Um zu zeigen, dass ProX ein Bindeprotein für kompatible Solute ist und zudem die

Substratspezifität des Proteins zu ermitteln, wurden kompetitive Bindeassays durchgeführt. Dazu wurde die Ammoniumsulfat-Präzipitationstechnik nach Richarme und Kepes (Richarme & Kepes, 1983) angewendet. Das gereinigte Protein wurde bei 85°C mit radioaktiv markiertem  $[1-^{14}\text{C}]$  Glycin Betain und einem 40-fachen Überschuss verschiedener nicht markierter kompatibler Solute inkubiert, mit Ammoniumsulfat ausgefällt, auf Nitrocellulosefilter gesaugt und mit Ammoniumsulfat gewaschen. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt. Zur Kontrolle wurde das Protein mit markiertem Glycin Betain allein und mit markiertem Glycin Betain mit einem 40-fachen Überschuss unmarkierten Glycin Betains vermessen. Unter den getesteten kompatiblen Soluten war nur Prolin Betain in der Lage mit Glycin Betain um die Bindung an ProX zu konkurrieren (Abb. 6). Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass Glycin Betain und Prolin Betain als Substrate für ProX dienen.

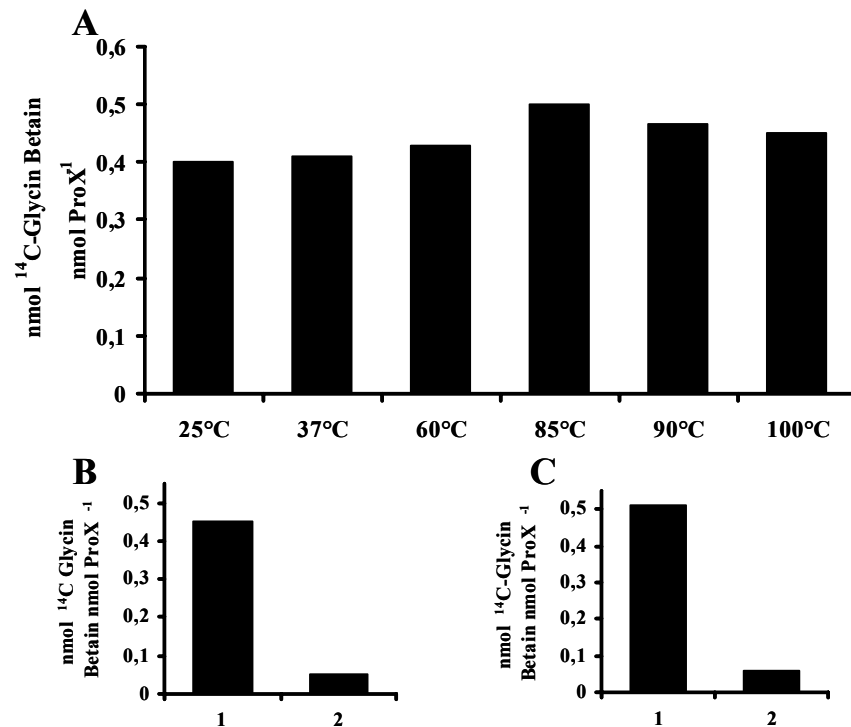


**Abb. 6: Substratspezifität von ProX**

Dargestellt ist das Ergebnis eines kompetitiven Bindeassays. 5  $\mu\text{M}$  gereinigtes Protein wurde mit 5  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ -Glycin Betain und einem 40-fachen Überschuss verschiedener unmarkierter kompatibler Solute bei 85°C inkubiert, mit Ammoniumsulfat ausgefällt und auf Nitrocellulosefilter gesaugt. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt. Um die Menge des gebundenen Glycin Betains ohne Konkurrenz zu bestimmen (100%), wurde das Protein mit 5  $\mu\text{M}$  markiertem Glycin Betain inkubiert. Aufgetragen sind die verschiedenen eingesetzten kompatiblen Solute gegen die verbleibende Bindung von  $[1-^{14}\text{C}]$ -Glycin Betain in Prozent. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt, gezeigt sind die entsprechenden Mittelwerte.

### 1.1.4 Temperaturabhängigkeit der Substratbindung

Die optimale Wachstumstemperatur von *A. fulgidus* ist 83°C. Es wurde überprüft, ob die Substratbindung auch jenseits dieser Temperatur erfolgt. Zu diesem Zweck wurde ProX 5 Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen mit [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain inkubiert und analog zu der Präzipitationsmethode (Abschnitt 1.1.3) weiterbehandelt. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt und in die Menge gebundenen Glycin Betains umgerechnet. ProX bindet sein Substrat bereits bei mesophilen Temperaturen (25°C) effektiv und ist auch in der Lage Glycin Betain bei Temperaturen weit oberhalb des Wachstumsoptimums (z.B. bei 100°C) zu binden (Abb. 7A). Dieses Experiment wurde mit längeren Inkubationszeiten (bis zu 30 Minuten) wiederholt und lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



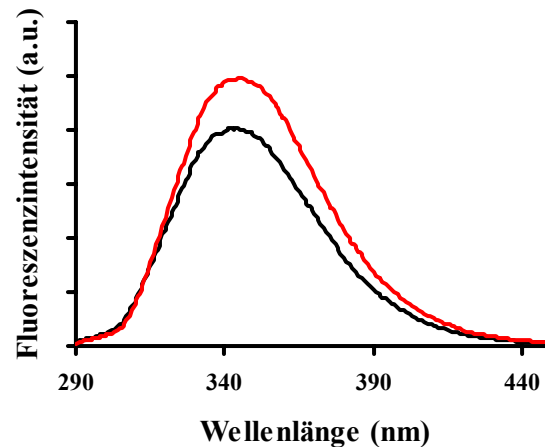
**Abb. 7: Temperaturabhängigkeit der Substratbindung**

(A) 5 µM ProX wurden bei unterschiedlichen Temperaturen mit 5 µM [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain inkubiert, ausgefällt und auf Nitrocellulosefilter gesaugt. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde bestimmt, in die gebundene Glycin Betain-Menge umgerechnet und gegen die Temperatur aufgetragen. (B) ProX wurde für 5 Minuten bei 25°C bzw. (C) 100°C mit markiertem Glycin Betain inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein Aliquot mit Ammoniumsulfat ausgefällt und die Menge gebundenen Glycin Betains wurde bestimmt (Säule 1). Unmittelbar danach wurde zu der übrigen Suspension ein 40-facher Überschuss unmarkiertes Glycin Betain gegeben, direkt ausgefällt und die im Protein verbliebene Menge Glycin Betain bestimmt (Säule 2).

Von dem Maltosebindeprotein (TMBP) aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus litoralis* ist bekannt, dass es Maltose bei niedrigen Temperaturen zwar bindet, aber die Dissoziation des Substrates vom Bindeprotein unter diesen Bedingungen deutlich verlangsamt stattfindet (Diez *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob das auch für ProX aus *A. fulgidus* zutrifft, wurde ein sogenannter Verdrängungstest durchgeführt. ProX wurde 5 Minuten bei 25°C bzw. 100°C mit radioaktiv markiertem Glycin Betain inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein Aliquot der Suspension mit Ammoniumsulfat ausgefällt und auf einen Filter gesaugt, um die Menge des gebundenen Glycin Betains zu bestimmen. Unmittelbar danach wurde zu der übrigen Suspension ein 40-facher Überschuss unmarkierten Glycin Betains gegeben, um das gebundene markierte Glycin Betain aus dem Protein zu verdrängen. Das Protein wurde unmittelbar nach der Zugabe des unmarkierten Glycin Betains ausgefällt und auf Filter gesaugt, um die Menge des im Protein verbliebenen markierten Glycin Betains zu bestimmen. Es zeigte sich, dass sowohl bei 25°C als auch bei 100°C die Dissoziation des Substrates in weniger als 5 Sekunden stattfindet (Abb. 7B und 7C). Im Maltosebindeprotein TMBP aus *T. maritima* liegt die Dissoziationszeit bei 22°C bei 50 Sekunden im Vergleich zu weniger als 3 Sekunden bei 80°C (Diez *et al.*, 2001).

### 1.1.5 Bestimmung der Affinitätskonstanten ( $K_D$ ) von ProX

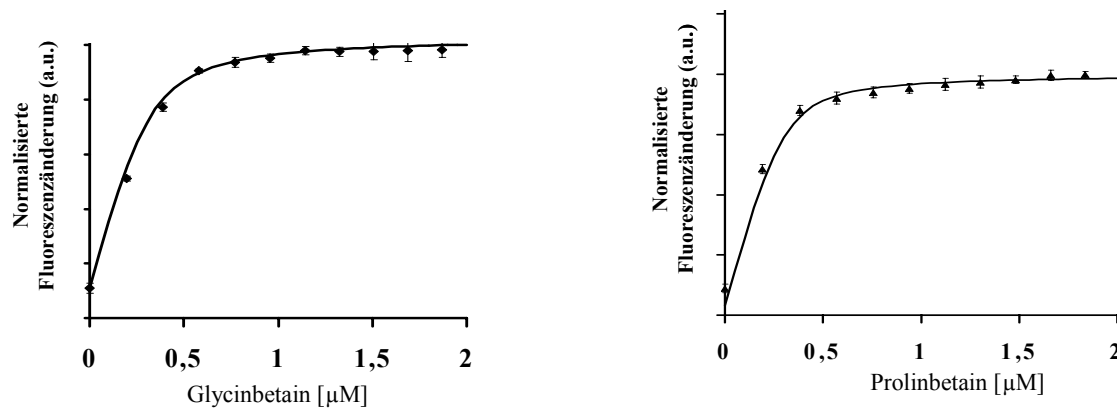
Bei der Bestimmung der Affinitätskonstanten von ProX für die beiden Substrate Glycin Betain und Prolin Betain wurde ausgenutzt, dass die Bindung beider Substrate die spektroskopischen Eigenschaften des Proteins beeinflusst. Die Bindung von Glycin Betain bzw. Prolin Betain führte zu einem Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Abb. 8).



**Abb. 8: Emissionsspektren von ProX ohne Substrat und substratgesättigt**

Gezeigt sind die Emissionsspektren von ProX bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm im substratfreien Zustand (■) und gesättigt mit Glycin Betain (■). Die Bindung von Glycin Betain führt zu einem Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins.

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten wurde das Protein mit ansteigenden Konzentrationen von Glycin Betain bzw. Prolin Betain titriert. Nach jeder Zugabe wurde ein Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen. Die Spektren wurden integriert, normalisiert und die Änderung der Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 9). Zur Ermittlung der jeweiligen Affinitätskonstanten wurden die Daten gefittet (s. Abschnitt 5.3.2 Material und Methoden). Die Auswertung der Daten zeigte, dass ProX für Glycin Betain eine  $K_D$  von 60 nM und für Prolin Betain eine  $K_D$  von 50 nM aufweist.



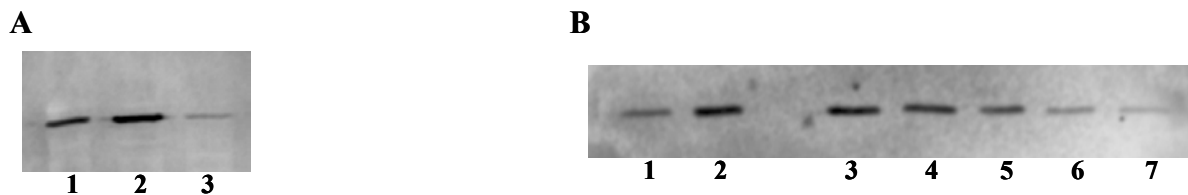
**Abb. 9: Bestimmung der Affinitätskonstanten von ProX für seine Substrate**

Für die Ermittlung der Affinitätskonstanten von ProX für Glycin Betain und Prolin Betain wurden 50 μg des Proteins mit ansteigenden Konzentrationen des jeweiligen Substrates titriert und nach jeder Substratzugabe wurde ein Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Die Spektren wurden integriert, normalisiert und die Fluoreszenzänderung wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratmenge aufgetragen. (A) zeigt die Fluoreszenzänderung bei der Zugabe von Glycin Betain und (B) die Fluoreszenzänderung bei der Zugabe von Prolin Betain. Die Affinitätskonstanten wurden durch Fitten der Daten mit Hilfe folgender Formel ermittelt:  $F = F_0 + (\Delta F / 2P_0) [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4L_0P_0)^{1/2}]$  dabei ist F die gemessene Fluoreszenz,  $F_0$  die Fluoreszenz des freien Proteins,  $\Delta F$  die Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung und  $P_0$  und  $L_0$  die Gesamtkonzentration des Proteins bzw. der Substrate.

### 1.1.6 Lokalisation und Quantifizierung von ProX in *A. fulgidus*

Mit Hilfe des gereinigten ProX gelang es einen spezifischen Antikörper für das Protein herzustellen. Dieser Antikörper erlaubte den Nachweis von ProX in Zellextrakten aus *A. fulgidus*. Substratbindepoteine liegen bekanntlich extrazellulär vor (Tam & Saier, 1993). In Gram-negativen Bakterien diffundieren die Bindeproteine frei im Periplasma und die äußere Membran verhindert einen Verlust in das umgebende Medium, während die Bindeproteine in Gram-positiven Bakterien über einen Cystein-gebundenen aminoterminalen Lipidanker in der Membran verankert sind (Sutcliffe & Russel, 1995). Da Archaea wie die Gram-positiven Bacteria ebenfalls keinen periplasmatischen Raum besitzen und ProX die typische Signalsequenz für eine Lipidmodifikation an einem Cysteinrest aufweist, wurde mittels Westernblot-Analysen untersucht, ob ProX in der Membranfraktion oder der löslichen

Fraktion (nach Ultrazentrifugation) von zellfreiem *A. fulgidus*-Extrakt lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurden gleiche Mengen Gesamtzellextrakt, Membranfraktion und lösliche Fraktion nach einer Ultrazentrifugation auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und das ProX Protein wurde mit einem Antikörper nachgewiesen (Abb. 10A). Wie der Westernblot zeigt, konnten 90 % von ProX in der Membran nachgewiesen werden. Das legt nahe, dass ProX in *A. fulgidus* ebenfalls membranassoziiert vorliegt.



**Abb. 10: Lokalisation und Quantifizierung von ProX in *A. fulgidus***

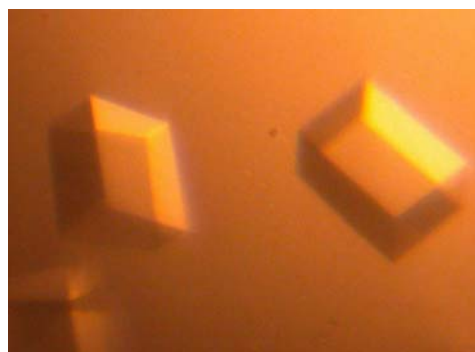
(A) Jeweils 30 µg Gesamtzellprotein (Spur 1), Membranen (Spur 2) und lösliche Fraktion (Spur 3) nach einer Ultrazentrifugation wurden auf einem SDS-Gels aufgetrennt und ProX wurde mittels eines Immunoblots detektiert. Der überwiegende Teil von ProX lässt sich in den Membranen von *A. fulgidus* detektieren. (B) Für einen quantitativen Westernblot wurden verschiedene Mengen gereinigtes ProX (75 ng: Spur 3; 50 ng: Spur 4; 25 ng: Spur 5; 15 ng: Spur 6 und 10 ng: Spur 7) und zwei unterschiedliche Mengen Gesamtzellprotein aus *A. fulgidus* (20 µg: Spur 1 und 40 µg: Spur 2) per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem ProX spezifischen Antiserum detektiert. Die Signale des gereinigten Proteins wurden zum Erstellen einer Eichreihe quantifiziert. Die Signalintensitäten des ProX aus Gesamtzellprotein konnte mit Hilfe der Eichreihe auf eine ProX-Konzentration umgerechnet werden und es gelang nachzuweisen, dass ProX einen Anteil von 0,2 % am Gesamtzellprotein hat. Hier ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Mehrfache Wiederholungen des Experiments verifizierten dieses Ergebnis.

Um der Frage nachzugehen, welchen Anteil das ProX-Protein am Gesamtzellprotein von *A. fulgidus* hat, wurde ein quantitativer Westernblot durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden bekannte Mengen des gereinigten Proteins und verschiedene Mengen Gesamtzellextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen geblottet und mit dem ProX-spezifischen Antiserum detektiert (Abb 10B). Die Signale des gereinigten Proteins wurden zur Erstellung einer Eichreihe quantifiziert und die Menge ProX im Gesamtzellextrakt wurde ermittelt. ProX hat einen Anteil von 0,2 % am Gesamtzellprotein von *A. fulgidus*.

### 1.1.7 Kristallisation und Lösung der Kristallstruktur von ProX

Es existiert bereits die Kristallstruktur eines Bindeproteins für Glycin Betain und Prolin Betain (ProX aus *E. coli*) (Breed *et al.*, 2001, Schiefner *et al.*, in Vorbereitung), die Einblicke in den Aufbau des Proteins und die Art der Substratbindung lieferte. In diesem Protein werden die Substrate über Kation- $\pi$ -Interaktionen gebunden, die über die delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme von drei Tryptophanresten im Protein vermittelt werden. Auf Sequenzebene finden sich zwischen ProX aus *E. coli* und ProX aus *A. fulgidus* lediglich geringe Übereinstimmungen (Sequenzidentität 21 %). Um herauszufinden, ob es in ProX aus *A. fulgidus* trotz der geringen Sequenzidentität und der thermostabilen Eigenschaften des ProX aus *A. fulgidus* Ähnlichkeiten in der Struktur und in der Art der Substratbindung gibt, wurde auch hier die Kristallstruktur gelöst. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Welte in Konstanz durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde das Protein von mir gereinigt und André Schiefner (AG Prof. Welte, Universität Konstanz) zur Kristallisation zur Verfügung gestellt. Für die Kristallisation des ProX-Proteins wurde die Methode des „hängenden Tropfens“ verwendet. Um Bedingungen für die Kristallisation zu ermitteln, wurde das heterolog überproduzierte und gereinigte ProX in einer Konzentration von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  und Reagenzien der Hampton Research Kits I und II und Wizard I und II verwendet. Bedingungen, unter denen Kristalle auftraten, wurden anschließend verfeinert, bis die Kristalle eine ausreichende Güte erreicht hatten.



**Abb. 11: Kristalle von Selenomethionin-markiertem ProX**

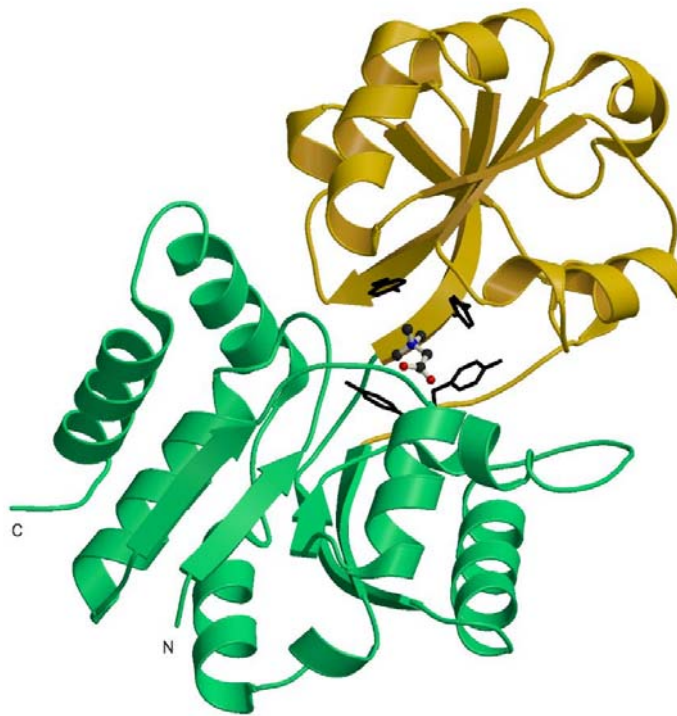
Dargestellt ist ein Foto von Kristallen von Selenomethionin-markiertem ProX. Die Kantenlänge beträgt (an der längeren Kante gemessen)  $250 \text{ }\mu\text{m}$ . Das Foto wurde von A. Schiefner zur Verfügung gestellt.

Da das Phasenproblem mit Selen als Schweratom über MAD (multi-wavelength anomalous



dispersion) gelöst werden sollte, wurde zudem Selenomethionin-markiertes Protein benötigt. Selenomethionin-markiertes ProX wurde wiederum von mir gereinigt und André Schiefner zur Kristallisation zur Verfügung gestellt. Die Kristalle, die mit diesem Protein erhalten wurden, sind in Abb. 11 dargestellt.

Um hochauflösende Beugungsdaten zu erhalten und die Bestimmung der Phasen mit Hilfe von Selen durchführen zu können, wurden Kristalle von nativem ProX und Selenomethionin-markiertem ProX (substratgesättigt mit Glycin Betain) am Synchrotron in Villigen (Schweiz) vermessen. Es wurden Datensätze erhalten, die sich bis zu einer Auflösung von 1,8 Å verfeinern ließen. Die Struktur wurde von André Schiefner gelöst und ist in Abb. 12 dargestellt.

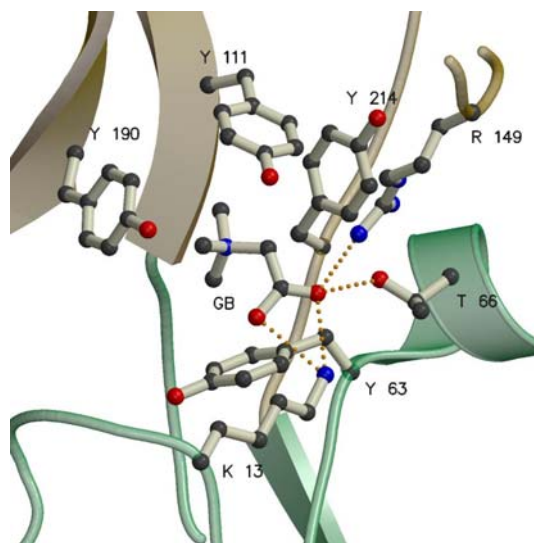


**Abb. 12: Modell von ProX mit gebundenem Glycin Betain**

Dargestellt ist ein Modell von ProX aus *A. fulgidus*. Die beiden Domänen sind in grün bzw. gelb dargestellt. C- und N-Terminus sind markiert. An der Substratbindung beteiligte Tyrosinreste sind in schwarz hervorgehoben. Das Substrat Glycin Betain ist als „ball and stick“-Modell abgebildet. Das Modell wurde von A. Schiefner zur Verfügung gestellt.

Trotz der geringen Sequenzidentitäten der Glycin Betain-Bindeproteine ProX aus *E. coli* und ProX aus *A. fulgidus* sind die Proteine in ihrer Struktur nahezu identisch. Wie zahlreiche andere periplasmatische Bindeproteine aus verschiedenen Bakterien (Quioco & Ledvina,

1996), ist ProX aus *A. fulgidus* aus zwei ähnlich gefalteten globulären Domänen aufgebaut, die über eine sogenannte Scharnierregion, bestehend aus zwei kurzen Polypeptidsegmenten, verbunden sind. Strukturanalysen von substratfreien und –gesättigten Bindeproteinen zeigten, dass die Bindung des Substrates mit einer substantiellen Konformationsänderung einhergeht, die über die Scharnierregion vermittelt wird (Sharff *et al.*, 1992; Shilton *et al.*, 1996). Beide Domänen von ProX bestehen aus einem zentralen Bereich mehrerer  $\beta$ -Faltblätter, der an beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Zwischen den beiden Domänen findet sich in einer tiefen Spalte die Substratbindetasche (Abb. 12). Das Substrat Glycin Betain wird in ProX von vier Tyrosinen (Tyr 63, Tyr 111, Tyr 190 und Tyr 214) umgeben, die Box-förmig um das Substrat angeordnet sind (dem Tyrosinrest 214 kommt dabei lediglich bei der Bindung von Glycin Betain in einer anderen Konformation eine Bedeutung zu, A. Schiefner, pers. Mitteilung). Damit wird die Substratbindung in ProX aus *A. fulgidus* offenbar genau wie in seinem Pendant aus *E. coli* über Kation- $\pi$ -Interaktionen vermittelt. Zusätzlich wird die Carboxylatgruppe von Glycin Betain über Wasserstoffbrücken mit Lysin 13, Threonin 66 und Arginin 149 koordiniert (Abb. 13).



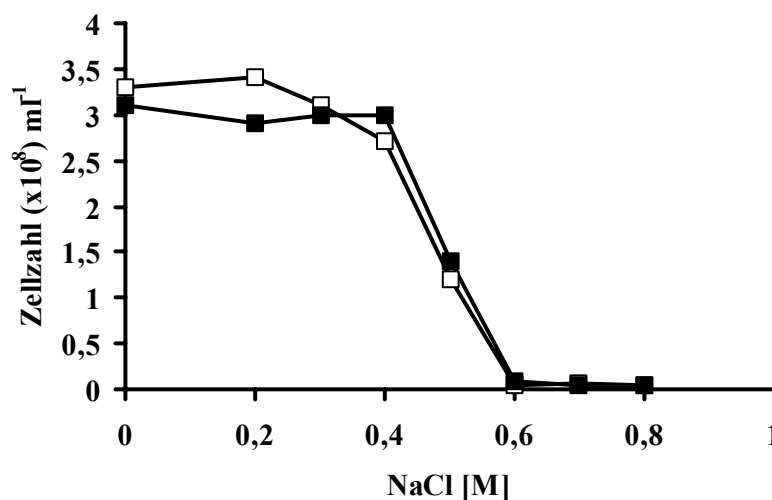
**Abb. 13: Detailansicht der Substratbindetasche mit gebundenem Glycin Betain**

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Substratbindetasche von ProX aus *A. fulgidus*. Die Substratbindung wird über Kation- $\pi$ -Interaktionen vermittelt, wobei die delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme der Tyrosinreste 63, 111 und 190 Interaktionen mit dem positiv geladenen Stickstoff von Glycin Betain vermitteln. Dem Tyrosinrest 214 kommt lediglich bei der Bindung von Glycin Betain in einer alternativen Konformation eine Rolle zu. Zusätzlich wird die Carboxylatgruppe des Substrates über Wasserstoffbrückenbindungen mit Lysin 13, Threonin 66 und Arginin 149 koordiniert. Die Abbildung wurde von A. Schiefner zur Verfügung gestellt.

## 1.2 Physiologische Rolle des ProU-Transporters in *A. fulgidus*

### 1.2.1 Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von *A. fulgidus* bei osmotischem Stress und auf die Expression von ProX

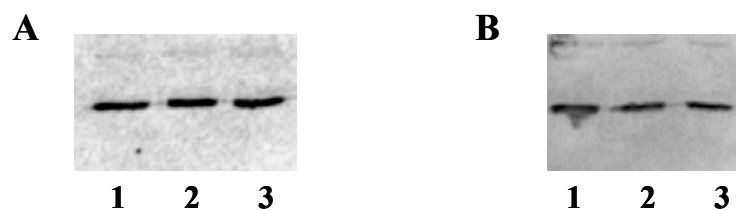
In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ProX ein hochaffines Bindeprotein für Glycin Betain und Prolin Betain ist. Daher ist davon auszugehen, dass *A. fulgidus* mit ProU ein effizientes Transportsystem für diese kompatiblen Solute zur Verfügung steht. Viele Bakterien (Galinski, 1995; Kempf & Bremer, 1998) und auch einige methanogene Archaea (Proctor *et al.*, 1997; Roessler *et al.*, 2002) nutzen Glycin Betain als osmotische Schutzsubstanz. Bisher ist aber noch in keinem hyperthermophilen Archaeon die osmoprotektive Wirkung von Glycin Betain nachgewiesen worden. Daher wurde in einem einfachen Wachstumsexperiment getestet, ob Glycin Betain einen Einfluss auf das Wachstumsvermögen von *A. fulgidus* bei erhöhter Osmolarität ausübt. Zu diesem Zweck wurde *A. fulgidus* aus einer Vorkultur, die in Minimalmedium ohne Zusatz von Salz kultiviert wurde, in Medien verschiedener Osmolarität mit bzw. ohne 2 mM Glycin Betain inokuliert und über Nacht bei 83°C inkubiert. Nach 20 Stunden wurde der Wachstumsertrag durch Auszählen der Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich, dass Glycin Betain keinen Einfluss auf die Osmotoleranz von *A. fulgidus* hat (Abb. 14)



**Abb. 14: Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von *A. fulgidus* bei NaCl-Stress**  
*A. fulgidus*-Zellen wurden in Medien verschiedener NaCl-Konzentration in An- (■) und Abwesenheit (□) von 2 mM Glycin Betain für 20 Stunden bei 83°C kultiviert und anschließend wurde der Wachstumsertrag durch Auszählung der Zellzahl bestimmt. Glycin Betain steigert die Osmotoleranz des Organismus nicht.

Das Experiment wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glycin Betain wiederholt, aber auch hier zeigte sich kein Effekt auf das Wachstumsvermögen von *A. fulgidus* unter hochosmolaren Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Um im nächsten Schritt zu überprüfen, ob erhöhte Osmolarität oder die Anwesenheit von Glycin Betain Einfluss auf die Expression von ProX haben, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Zellen in Medien verschiedener Osmolaritäten bzw. mit verschiedenen Glycin Betain-Konzentrationen gezogen und aus diesen Kulturen Zellextrakte präpariert. Gleiche Mengen dieser Extrakte wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und ProX mit Hilfe von Immunoblots detektiert. Es zeigte sich, dass weder die Osmolarität des Mediums, noch die Anwesenheit von Glycin Betain einen Einfluss auf die Expression von ProX ausüben (Abb. 15).



**Abb. 15: Einfluss der Osmolarität bzw. des Glycin Betaingehalts des Mediums auf die Expression von ProX**

Dargestellt sind Westernblot-Analysen von Zellextrakten aus *A. fulgidus* Zellen, die mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (A) (Spur 1: 0M NaCl; Spur 2: 0,3 M NaCl und Spur 3 0,6 M NaCl) bzw. unterschiedlichen Glycin Betain-Konzentrationen (B) (Spur 1: 0 mM Glycin Betain; Spur 2: 5 mM Glycin Betain und Spur 3: 10 mM Glycin Betain) gezogen wurden. ProX wurde mit dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Antikörper detektiert.

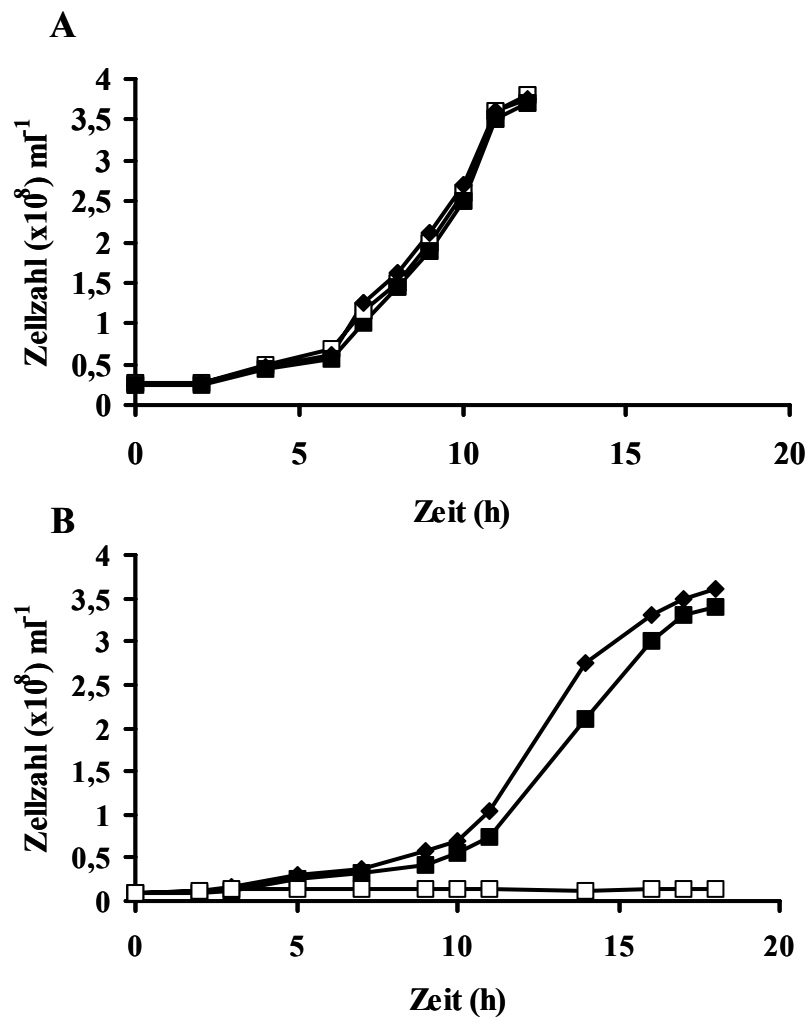
### 1.2.2 Mögliche Rolle von Glycin Betain als C- oder N-Quelle

Einige Mikroorganismen sind in der Lage Glycin Betain nicht nur als Stressprotektivum zu nutzen, sondern auch anabol oder katabol zu verstoffwechseln (Boncompagni *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1988). Um festzustellen, ob *A. fulgidus* ebenfalls in der Lage ist Glycin Betain als Substrat zu nutzen, wurde der Organismus in definiertem Minimalmedium ohne Kohlenstoff bzw. Stickstoffquelle in Anwesenheit von 10 mM Glycin Betain kultiviert. Unter diesen Bedingungen war *A. fulgidus* nicht in der Lage zu wachsen. Damit war ausgeschlossen,

dass Glycin Betain dem Organismus als Energiesubstrat bzw. Stickstoffquelle dient.

### 1.2.3 Einfluss von Glycin Betain bzw. Prolin Betain auf das Wachstum von *A. fulgidus* bei Temperaturen jenseits des Wachstumsoptimums

In den vorrangegangenen Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass Glycin Betain in *A. fulgidus* als Osmoprotektivum fungiert und zudem konnte gezeigt werden, dass Glycin Betain diesem Organismus weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle dient. Da bekannt ist, dass kompatible Solute neben ihren osmoprotektiven Eigenschaften auch thermoprotektiv wirken können (Caldas *et al.*, 1999; Canovas *et al.*, 2001), wurde der Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von *A. fulgidus* jenseits des Wachstumsoptimums getestet. *A. fulgidus* wächst in einem Temperaturbereich zwischen 60°C und 90°C mit einem Wachstumsoptimum bei 83°C (Stetter *et al.*, 1987). Dabei ist zu bedenken, dass dieser Wachstumsbereich in einem Medium mit Hefeextrakt ermittelt wurde, der Glycin Betain enthält (Dulaney *et al.*, 1968). In den folgenden Experimenten wurde dagegen in einem definierten Minimalmedium gearbeitet, in dem der Hefeextrakt durch eine Vitaminlösung ersetzt wurde. Um zunächst auszuschließen, dass Glycin Betain und Prolin Betain schon bei der optimalen Wachstumstemperatur einen Einfluss auf die Wachstumsrate von *A. fulgidus* haben, wurde das Wachstum von *A. fulgidus* bei der optimalen Wachstumstemperatur von 83°C mit und ohne Glycin Betain bzw. Prolin Betain verfolgt. Dazu wurden auf 83°C vorgewärmte Medien ohne bzw. mit 2 mM Glycin Betain oder Prolin Betain inokuliert und das Wachstum der Zellen wurde verfolgt. Es stellte sich heraus, dass beide Verbindungen unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Wachstumsrate von *A. fulgidus* haben (Abb. 16A). Um den Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstumsvermögen von *A. fulgidus* bei Hitzestress zu untersuchen, wurde eine Vorkultur von *A. fulgidus* bei 83°C ohne Glycin Betain gezogen. Diese Kultur wurde weiter verwendet, um auf 83°C vorgewärmte Medien ohne bzw. mit 2 mM Glycin Betain oder Prolin Betain anzupflanzen. Die Kulturen wurden anschließend innerhalb von 15 Minuten auf eine Temperatur von 90°C erhitzt und bei dieser Temperatur inkubiert. Die Zunahme der Zellzahl wurde durch Zählen verfolgt (Abb. 16B). *A. fulgidus* ist bei 90°C ohne den Zusatz von einem der kompatiblen Solute nicht in der Lage, zu wachsen. Steht dem Organismus jedoch Glycin Betain oder Prolin Betain zur Verfügung, ist auch bei 90°C ein Wachstum möglich. Die lag-Phase ist dabei im Vergleich zu Zellen, die bei 83°C kultiviert wurden um circa 4 Stunden länger und die Wachstumsrate ist mit 0,23 h<sup>-1</sup> im Vergleich zu 0,35 h<sup>-1</sup> geringer als bei der optimalen Wachstumstemperatur.



**Abb. 16:** Einfluss von Glycin Betain bzw. Prolin Betain auf das Wachstum von *A. fulgidus* bei 83°C bzw. 90°C

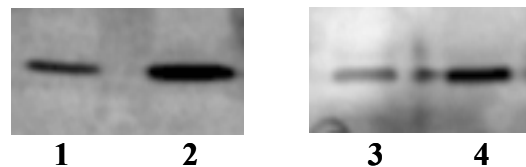
Dargestellt sind Wachstumskurven von *A. fulgidus*, die bei 83°C (A) bzw. 90°C (B) ohne Zusatz (□) mit 2mM Glycin Betain (■) bzw. 2 mM Prolin Betain (◆) aufgenommen wurden. In beiden Fällen wurden die Kulturen mit Zellen inokuliert, die bei 83°C kultiviert worden waren.

Datenbankanalysen (Altschul *et al.*, 1990), in denen im Genom von *A. fulgidus* nach Homologen zu den Opu-Transportern aus *B. subtilis*, dem Ota-Transporter aus *M. mazei* und ProU und ProP aus *E. coli* gesucht wurden, ergaben, dass *A. fulgidus* neben ProU vermutlich keine weiteren Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute besitzt. Es ist jedoch möglich, dass ProU noch andere Substrate transportiert, ohne dass eine Bindung dieser Substrate an das Bindeprotein nachgewiesen werden kann. Das gleiche gilt für das Substratbindeprotein von ProU aus *E. coli*: Es besitzt dieselben Substrate wie ProX aus *A. fulgidus*, der Transporter kann aber zusätzlich auch andere Trimethylammoniumverbindungen und Prolin transportieren (Haardt *et al.*, 1995). Um zu überprüfen, ob andere

Solute auch eine hitzeprotektive Wirkung in *A. fulgidus* ausüben, wurden Wachstumsexperimente bei 90°C in Anwesenheit von Prolin, Cholin oder Carnitin durchgeführt. Alle drei Solute zeigten keinerlei wachstumsfördernde Eigenschaften unter Hitzestress.

#### 1.2.4 Einfluss von Hitzestress auf die Expression von ProX

Die Expression von ProX wird weder durch das Vorhandensein von Glycin Betain noch von der Osmolarität des Mediums beeinflusst (Abb. 15). Um der Frage nachzugehen, ob Hitzestress eine Auswirkung auf die Expression von ProX hat, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Zellen bei 83°C und bei 90°C in Anwesenheit von 2 mM Glycin Betain bzw. Prolin Betain bis zum Erreichen der stationären Phase gezogen und es wurden Zellextrakte präpariert. Gleiche Mengen der Zellextrakte wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf Membranen geblottet. Mit einem ProX-spezifischen Antikörper wurde das Protein detektiert und die Signalintensitäten wurden quantifiziert. Es stellte sich heraus, dass die Menge von ProX in Zellextrakten von *A. fulgidus* bei 90°C in Anwesenheit von Glycin Betain bzw. Prolin Betain 3-5 mal höher ist als bei 83°C (Abb. 17).



**Abb. 17: Expression von ProX unter Hitzestress**

Zellextrakte von Zellen, die bei 83°C (Spur 1 und 3) und bei 90°C in Anwesenheit von Glycin Betain (Spur 2) bzw. Prolin Betain (Spur 4) kultiviert wurden, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen geblottet und mit einem ProX-spezifischen Antikörper detektiert. Die Signalintensitäten wurden quantifiziert.

#### 1.2.5 Versuche zur Glycin Betain-Transportaktivität

Bisher konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Bindeprotein ProX des ProU-Transporters kompatible Solute bindet und daher war davon auszugehen, dass der ProU-Transporter als Aufnahmesystem für diese Verbindungen fungiert. Zudem wirken Glycin Betain und Prolin

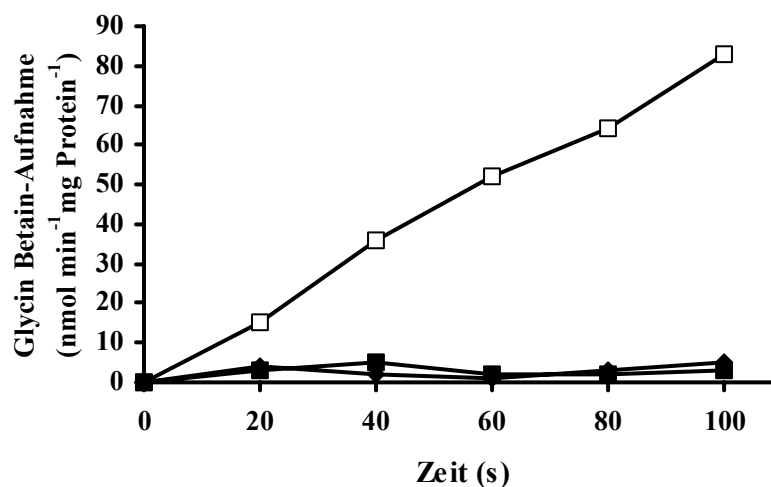
Betain in *A. fulgidus* hitzeprotektiv. Zur Charakterisierung der kinetischen Parameter von ProU und zur Ermittlung der angehäuften Menge kompatibler Solute unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wäre es wünschenswert gewesen, die Aufnahme dieser Verbindungen direkt *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten Transportassays mit radioaktiv markiertem [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain durchgeführt werden. Da davon auszugehen war, dass der Transport in *A. fulgidus* nur unter anaeroben Bedingungen erfolgt, wurden diese Experimente in versiegelten Serumflaschen bzw. in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Anaerobenzelt durchgeführt. Es konnte jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen die Aufnahme von Glycin Betain nachgewiesen werden und so im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Transportassay für die Aufnahme von Glycin Betain etabliert werden. Um auszuschließen, dass Glycin Betain widererwarten tatsächlich nicht in die Zellen aufgenommen wird, wurde auch versucht die Aufnahme von L-[<sup>14</sup>C]-Prolin nachzuweisen, für das *A. fulgidus* laut Datenbankanalysen ebenfalls Transportsysteme besitzt. Auch die Aufnahme dieser Verbindung konnte nicht gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass die verwendeten Methoden für den Nachweis der Aufnahme <sup>14</sup>C-markierter Verbindungen in *A. fulgidus* generell nicht geeignet sind.

### **1.2.6 Komplementation einer Glycin Betain Aufnahme defekten *E. coli*-Mutante mit ProU aus *A. fulgidus***

Es ist in einigen Fällen möglich, Proteine aus hyperthermophilen Archaea in mesophilen aeroben Organismen funktionell zu exprimieren (Piper *et al.*, 1996) und damit die Eigenschaften der entsprechenden Polypeptide in diesen Organismen zu untersuchen. Daher wurde versucht, die Glycin Betain-Aufnahme-defekte *E. coli*-Mutante MKH13 (Haardt *et al.*, 1995) mit dem ProU-Transporter aus *A. fulgidus* zu komplementieren. Zu diesem Zweck wurde das gesamte *proU*-Gencluster in einen Expressionsvektor kloniert. Um auszuschließen, dass der archaeelle Promotor in *E. coli* nicht erkannt wird, wurde *proU* in diesem Konstrukt (pGH22) unter die Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors gebracht. Zunächst wurde die *E. coli* Mutante MKH13 mit dem Codon Plus RIL-Plasmid (Stratagene) transformiert, um das Vorhandensein von seltenen t-RNAs für Arginin, Isoleucin und Leucin, die von *A. fulgidus* genutzt werden, zu gewährleisten. Anschließend wurde dieser Stamm mit dem Vektor pGH22 transformiert und in den folgenden Experimenten eingesetzt. In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob das *proU*-Gencluster aus *A. fulgidus* der *E. coli*-Mutante wieder ermöglicht, Glycin Betain zu transportieren. Zu diesem Zweck wurde der



Stamm bis zu einer optischen Dichte (578 nm) von 0,3 kultiviert und die Expression des *proU*-Genclusters wurde durch die Zugabe von 0,02 % Rhamnose induziert. 15 und 30 Minuten nach der Induktion wurde die Glycin Betainaufnahme mit Hilfe von [ $^{14}\text{C}$ ]-Glycin Betain bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Glycin Betainaufnahme parallel in dem *E. coli*-Wildtyp MC4100 und der *E. coli*-Mutante MKH13 (mit dem Codon Plus RIL-Plasmid und dem leeren Überexpressionsvektor pJoe2702) vermessen. Es stellte sich heraus, dass der ProU-Transporter aus *A. fulgidus* den Glycin Betain-Transportdefekt der MKH13-Mutante nicht komplementieren kann (Abb. 18). Um sicherzustellen, dass die Komplementation nicht aufgrund einer fehlenden Expression der einzelnen Komponenten fehlschlug, wurden Zellextrakte vor und nach der Induktion mit Rhamnose auf SDS-Gelen analysiert. Es ließ sich deutlich erkennen, dass das Bindeprotein ProX und die ATPase ProV nach der Induktion verstärkt exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Eine Überproduktion der Membrankomponenten (ProW2 und ProW1) ließ sich auf dem Gel nicht erkennen, was jedoch bei der Überproduktion von Membranproteinen häufig der Fall ist.



**Abb. 18: Bestimmung der Glycin Betain-Aufnahme der *E. coli*-Mutante MKH13, die das *proU*-Gencluster aus *A. fulgidus* exprimiert**

Dargestellt ist die Glycin Betain-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit in der Glycin Betain-Transportdefekten *E. coli*-Mutante MKH13, die das gesamte *proU*-Gencluster aus *A. fulgidus* exprimiert (■). Zur Kontrolle wurde die Glycin Betain-Aufnahme im *E. coli* Wildtyp MC4100 (□) und der MKH13-Mutante (◆) bestimmt, die jeweils das leere Überexpressionsplasmid und das Codon-Plus Plasmid enthielten.

Da es denkbar ist, dass der Glycin Betain Transport durch das *A. fulgidus* ProU Transportsystem in *E. coli* aufgrund der (im Vergleich zum Wachstumsoptimum von *A. fulgidus*) niedrigen Temperatur sehr langsam abläuft und damit innerhalb der kurzen Messzeit kein Transport nachweisbar ist, wurde noch ein zweiter Ansatz gewählt. Die *E. coli* Mutante MKH13 ist im Gegensatz zu ihrem Vaterstamm MC4100 auch in Anwesenheit von 1 mM Glycin Betain nicht in der Lage auf Hochsalzagarplatten (0,8 M NaCl) zu wachsen. Sollte das ProU-System aus *A. fulgidus* aber in *E. coli* funktionell sein, wäre es zu erwarten, dass der MKH13-Stamm, der dieses System exprimiert, wieder in der Lage ist auf Hochsalzplatten mit 1 mM Glycin Betain zu wachsen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der MKH13-Stamm mit dem Plasmid pGH22 auf Hochsalzplatten mit 1 mM Glycin Betain, den entsprechenden Antibiotika und mit oder ohne 0,02 % Rhamnose (zur Induktion der ProU-Expression) ausgestrichen. Als Negativkontrolle diente die MKH13-Mutante und als Positivkontrolle der Wildtyp MC4100, jeweils mit leerem Expressionsplasmid. Der einzige Stamm, der in der Lage war auf diesen Platten zu wachsen, war der *E. coli* Wildtyp. Selbst nach 14 Tagen Inkubation zeigte die Mutante, die das *proU*-Gencluster aus *A. fulgidus* exprimiert, kein Wachstum. Daher ist davon auszugehen, dass ProU aus *A. fulgidus* den Glycin Betain-Transportdefekt der MKH13-Mutante nicht komplementieren kann.

## 2. Thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute in *B. subtilis*

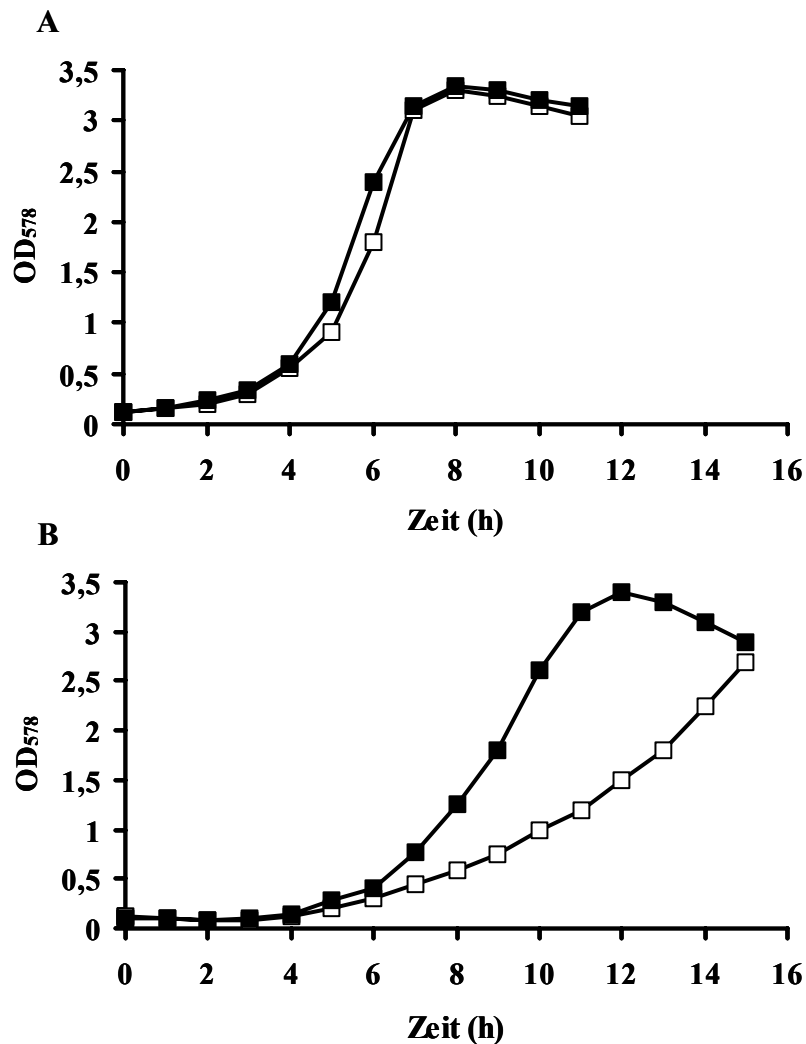
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glycin Betain und Prolin Betain in *A. fulgidus* thermoprotektiv wirken. Die hitzeperotektive Wirkung einiger kompatibler Solute war auch schon aus Untersuchungen in einigen Pflanzen (Alia *et al.*, 1998; Chen & Murata, 2002) und Gram negativen Bakterien (Caldas *et al.*, 1999; Canovas *et al.*, 2001) bekannt. Im Folgenden sollte nun analysiert werden, ob kompatible Solute auch in *B. subtilis* als Hitzeperotektiva fungieren.

### 2.1 Effekt von Glycin Betain auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C

In einem ersten Schritt wurde analysiert, bis zu welcher Temperatur der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 in definiertem Minimalmedium (SMM) in der Lage ist, zu wachsen. Dabei stellte sich heraus, dass die maximale Wachstumstemperatur dieses Stammes in Minimalmedium bei 52°C liegt. Diese Temperatur wurde in allen folgenden Experimenten gewählt, um die Wirkung von kompatiblen Soluten auf das Wachstum von *B. subtilis* bei Hitzestress näher zu untersuchen. Zunächst wurde geklärt, ob Glycin Betain bereits bei 37°C wachstumsfördernd wirkt. Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Zellen in auf 37°C vorgewärmtes SMM-Medium ohne bzw. mit 1 mM Glycin Betain auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 inokuliert und bei dieser Temperatur kultiviert. Das Wachstum wurde über die Zeit verfolgt und es stellte sich heraus, dass Glycin Betain unter diesen Bedingungen keinen Effekt auf das Wachstum von *B. subtilis* ausübt (Abb. 19A). Dieses Experiment wurde bei 52°C wiederholt. Wiederum wurde auf 37°C vorgewärmtes Medium (mit bzw. ohne 1 mM Glycin Betain) mit exponentiell wachsenden *B. subtilis* Zellen beimpft, die bei 37°C gezogen worden waren. Anschließend wurden die Kulturen innerhalb von 15 Minuten auf 52°C erhitzt und das Wachstum bei dieser Temperatur verfolgt. Bei dieser Temperatur hatte die Kultur, der Glycin Betain zur Verfügung stand eine deutlich kürzere lag-Phase und die Wachstumsrate  $\mu$  war mit 0,39 h<sup>-1</sup> doppelt so hoch wie die Wachstumsrate der Kultur (0,2 h<sup>-1</sup>), die ohne Glycin Betain wuchs (Abb. 19B). Glycin Betain wirkt also auch in *B. subtilis* hitzeperotektiv.

In *A. fulgidus* konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Glycin Betain im Medium dem Organismus sogar ermöglicht, oberhalb seiner maximalen Wachstumstemperatur zu wachsen. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob Glycin Betain diese Wirkung auch in *B. subtilis* hat, wurden Kulturen bei 53°C bzw. 54°C in An- und Abwesenheit von Glycin Betain gezogen.

Bei diesen Temperaturen war *B. subtilis* aber auch in Anwesenheit von Glycin Betain nicht in der Lage, zu wachsen. Das bedeutet, dass Glycin Betain die maximale Wachstumstemperatur von *B. subtilis* nicht erhöhen kann.

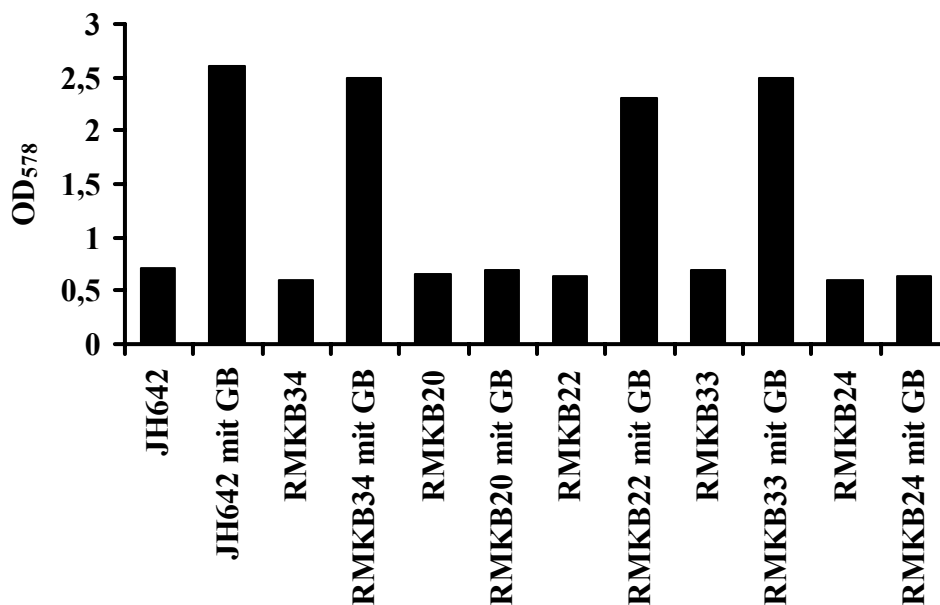


**Abb. 19: Einfluss von Glycin Betain auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 37°C und 52°C**

Dargestellt sind Wachstumskurven des *B. subtilis* Wildtyps JH642 bei 37 °C (A) und 52°C (B). Der Stamm wurde in Abwesenheit (□) und in Anwesenheit (■) von 1 mM Glycin Betain kultiviert .

## 2.2 Beteiligung der Opu-Transporter an der Aufnahme von Glycin Betain unter Hitzestress

Aus Untersuchungen zur Osmoregulation von *B. subtilis* ist bekannt, dass dem Organismus drei Transportsysteme zur Aufnahme von Glycin Betain zur Verfügung stehen: OpuA, OpuC und OpuD (Kappes *et al.*, 1996; Kempf & Bremer, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob *B. subtilis* unter Hitzestress ebenfalls diese Opu-Transporter zur Aufnahme von Glycin Betain nutzt, oder ob dem Organismus unter diesen Bedingungen ein anderes Aufnahmesystem für diese Verbindung zur Verfügung steht. Um diese Frage zu klären, wurden Wachstumsexperimente mit verschiedenen Mutantenstämmen gemacht, die jeweils nur ein bzw. kein Opu-System funktionell exprimieren. Der *B. subtilis* Wildtyp und die Mutantenstämme RMKB20 (OpuB<sup>+</sup>), RMKB22 (OpuC<sup>+</sup>), RMKB24 (OpuA<sup>-</sup>, OpuB<sup>-</sup>, OpuC<sup>-</sup>, OpuD<sup>-</sup>), RMKB33 (OpuD<sup>+</sup>) und RMKB34 (OpuA<sup>+</sup>) wurden bei 52°C ohne bzw. mit 1 mM Glycin Betain gezogen und der Wachstumsertrag wurde nach 12 Stunden bestimmt. Die Stämme die OpuA, OpuC oder OpuD funktionell exprimierten, wurden unter diesen Bedingungen durch Glycin Betain protektiert, während die Mutante, die nur OpuB (spezifisch für Cholin) bzw. keinen der Opu-Transporter exprimierte, in Anwesenheit von Glycin Betain den gleichen Wachstumsertrag lieferten, wie ohne diese Verbindung (Abb. 20).

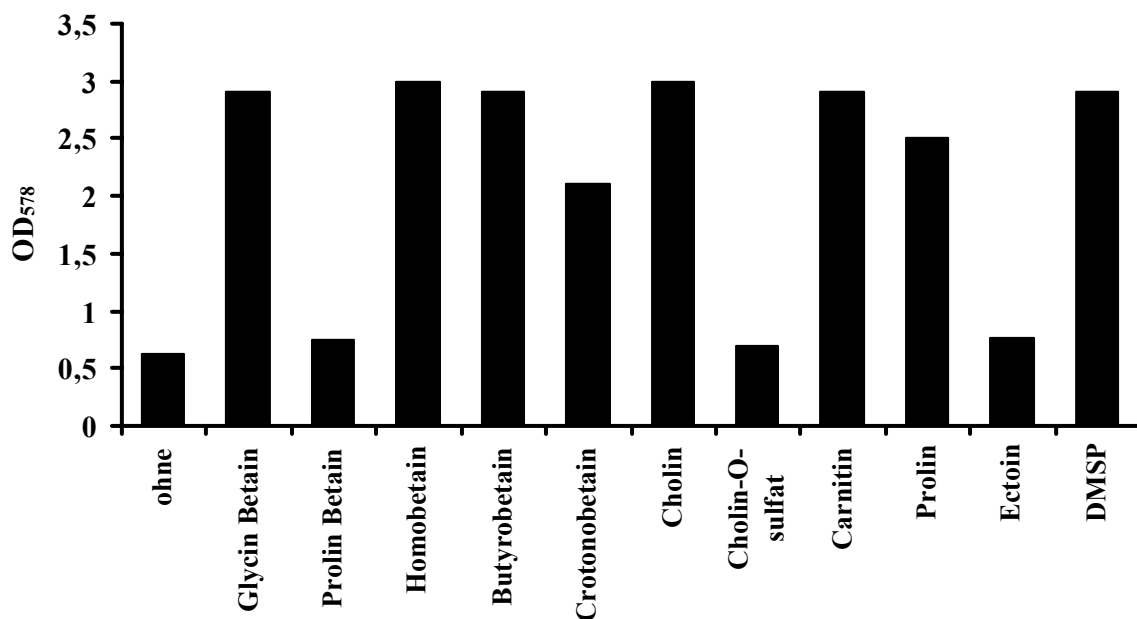


**Abb. 20: *B. subtilis* nutzt auch unter Hitzestress die Opu-Transporter für die Aufnahme von Glycin Betain**

Dargestellt ist der Wachstumsertrag des Wildtyps JH642 und der Mutantenstämme RMKB20 (OpuB<sup>+</sup>), RMKB22 (OpuC<sup>+</sup>), RMKB24 (OpuA<sup>-</sup>, OpuB<sup>-</sup>, OpuC<sup>-</sup>, OpuD<sup>-</sup>), RMKB33 (OpuD<sup>+</sup>) und RMKB34 (OpuA<sup>+</sup>) nach 12 Stunden Wachstum bei 52°C ohne bzw. mit 1 mM Glycin Betain (GB).

### 2.3 Wirkung verschiedener kompatibler Solute auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C

Die Opu-Transporter dienen nicht nur der Aufnahme von Glycin Betain, sondern transportieren eine Reihe weiterer kompatibler Solute. Um festzustellen, ob diese Verbindungen ebenfalls fördernd auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C wirken, wurde die Wirkung dieser Substrate der Opu-Transporter in einem einfachen Wachstumsexperiment getestet. Der Wildtypstamm JH642 wurde ohne und mit jeweils 1 mM Glycin Betain, Prolin Betain, Homobetain,  $\gamma$ -Butyrobetain, Crotonobetain, Cholin-O-sulfat, Carnitin Prolin, Ectoin oder Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) bei 52°C kultiviert. Nach 12 Stunden wurde der Wachstumsertrag der verschiedenen Kulturen bestimmt. Bis auf Cholin-O-sulfat, Ectoin und Prolin Betain förderten alle anderen verwendeten Solute das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C (Abb. 21) und haben damit neben ihren osmoprotektiven Eigenschaften auch thermoprotektive Eigenschaften.



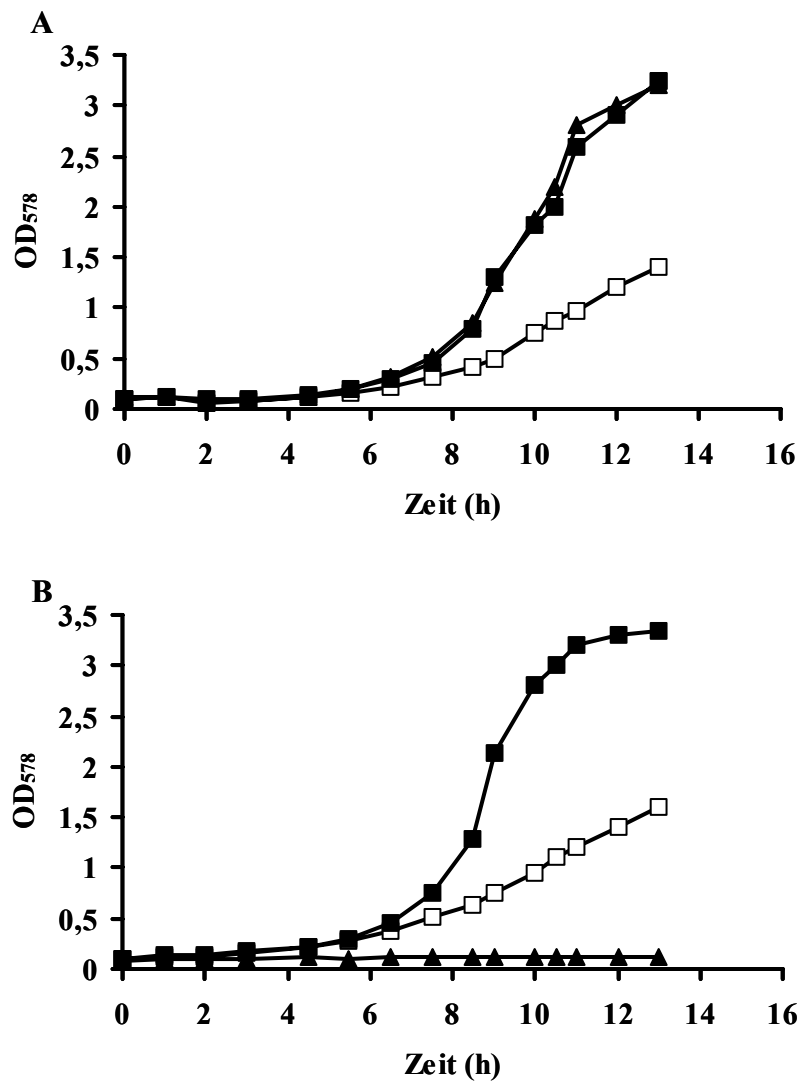
**Abb. 21: Wirkung unterschiedlicher Solute auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C**

Dargestellt ist der Wachstumsertrag von *B. subtilis* JH642-Kulturen, die für 12 Stunden ohne oder mit jeweils 1 mM der angegebenen kompatiblen Solute bei 52°C kultiviert wurden.

In einem zusätzlichen Experiment wurde überprüft, ob die Substratspezifität (s. Abb 3, Einleitung) der Opu-Transporter unter Hitzestress dieselbe ist, wie unter osmotischem Stress. Zu diesem Zweck wurden die Mutanten, die jeweils nur einen der Opu-Transporter exprimieren (s. Abschnitt 2.2) bei 52°C mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten inkubiert und das Wachstum wurde verfolgt. Die Solute, die das Wachstum der entsprechenden Mutante bei 52°C förderten, wurden als Substrat für den jeweils exprimierten Opu-Transporter gewertet. Dabei stellte sich heraus, dass die Transporter unter Hitzestress erwartungsgemäß dieselbe Substratspezifität aufweisen, wie bei osmotischem Stress (Daten nicht gezeigt).

## 2.4 Cholin ist nicht *per se* hitzeprotektiv

Die Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung verschiedener kompatibler Solute im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass auch Cholin das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C fördert. Aus Untersuchungen zur osmoprotektiven Wirkung von Cholin ist bekannt, dass diese Verbindung an sich nicht osmoprotektiv wirkt, sondern zu diesem Zweck erst durch eine zweistufige Oxidation, die von den Enzymen GbsB und GbsA katalysiert wird, zu Glycin Betain umgesetzt werden muss (Boch *et al.*, 1996). Daher stellte sich die Frage, ob die hitzeprotektive Wirkung von Cholin auch von der Umsetzung zu Glycin Betain abhängig ist, oder ob Cholin bei Temperaturen oberhalb des Wachstumsoptimums tatsächlich *per se* als Hitzeprotektivum fungiert. Um dieser Frage nachzugehen wurde der Stamm JBB5 [ $\Delta(gbsAB::neo)2$ ] (Boch *et al.*, 1996), dem die Enzyme zur Umsetzung von Cholin zu Glycin Betain fehlen, näher untersucht. In einem Wachstumsexperiment wurden der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 und die Mutante JBB5 bei 52°C ohne und mit 1 mM Cholin bzw. Glycin Betain kultiviert und das Wachstum wurde über die Zeit verfolgt. Wie aus Abb. 22 deutlich wird, fördert Cholin das Wachstum des Wildtyps JH642 bei 52°C im gleichen Maße wie Glycin Betain (Abb. 22A). Die Mutante JBB5 dagegen wird durch Glycin Betain protektiert, während sie in Anwesenheit von Cholin bei 52°C nicht in der Lage ist, zu wachsen (Abb. 22B), was auf einen toxischen Effekt von Cholin zurückzuführen ist. Dieses Experiment macht deutlich, dass Cholin auch unter Hitzestress zunächst zu Glycin Betain umgesetzt werden muss, bevor es hitzeprotektiv wirken kann und damit nicht *per se* protektiv ist.



**Abb. 22: Wachstum des Wildtypstammes JH642 und der Mutante JBB5 bei 52°C mit Cholin und Glycin Betain**

Dargestellt sind Wachstumskurven des Wildtyps (A) und der GbsAB-Mutante JBB5 (B) bei 52°C in Abwesenheit kompatible Solute (□), mit 1 mM Glycine Betaine (■) und mit 1 mM Cholin (▲).

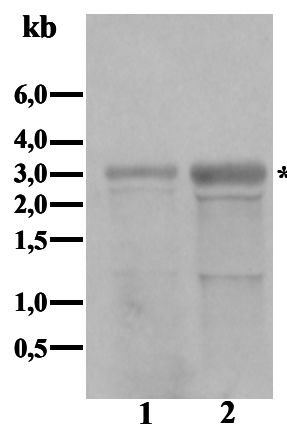
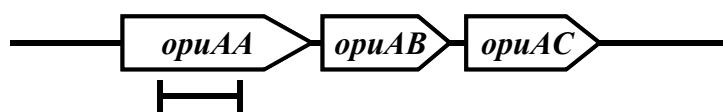
## 2.5 Einfluss von Hitzestress auf die Expression der *opu*-Gene

Die Analyse der Opu-Transporter im Zusammenhang mit der Osmostressantwort von *B. subtilis* ergab, dass die Expression der Transporter OpuA, OpuC, OpuD und OpuE einer osmotischen Kontrolle unterliegt (Kempf & Bremer, 1998), während die Expression von OpuB vom Vorhandensein des Substrats Cholin beeinflusst wird (Nau-Wagner, 1999). Da

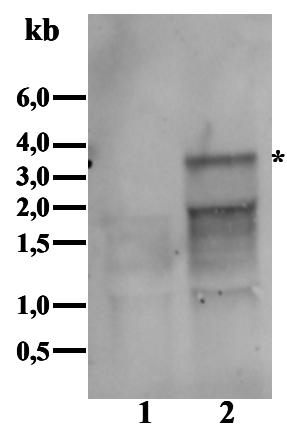
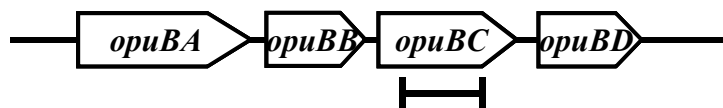


offenbar allen Opu-Transportern auch bei Hitzestress eine entscheidende Bedeutung zukommt, wurde die Expression der entsprechenden Gene unter Hitzestress mit Hilfe von Northernblot-Analysen untersucht. Zu diesem Zweck wurden *B. subtilis* Wildtypzellen bei 37°C und bei 52°C bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1 inkubiert und zur RNA-Isolation verwendet. Für die Northernblots wurde jeweils 1 µg (für den Nachweis der *opuA*-Transkripte) bzw. 4 µg (für den Nachweis der *opuB*-, *opuC*-, *opuD* und *opuE*-Transkripte) der RNA in MOPS-Agarosegelen aufgetrennt und auf Membranen übertragen. Die Detektion der *opu*-Transkripte erfolgte mit spezifischen DIG-markierten RNA Sonden. Die *opuA*-Sonde lieferte ein Signal der Größe von etwa 3000 Basen, was gut mit der Größe des *opuA*-Operons (2979 bp) übereinstimmt. Mit der *opuB*-wurden drei mRNA-Spezies detektiert, von denen die größte etwa 3400 Basen umfasste und damit dem Transkript des gesamten Operons (3390 bp) entspricht, während die anderen detektieren mRNA-Spezies (circa 2000 Basen und 1000 Basen) vermutlich Abbauprodukte des primären Transkriptes sind. Mit der *opuC*-Sonde wurden ebenfalls drei mRNA-Spezies detektiert, von denen die größte (3400 Basen) wieder mit der Größe des gesamten Operons (3387 bp) übereinstimmt und die beiden kleineren (etwa 2000 und 1000 Basen) wahrscheinlich ebenfalls Abbauprodukte des primären Transkriptes sind. Die *opuD*-Sonde lieferte zwei Signale, von denen das kleinere (1500 Basen) der Größe des *opuD*-Gens entspricht. Die größere mRNA-Spezies (etwa 2600 Basen) könnte aus einen Durchlesen des stromaufwärts gelegenen Gens *ytfP* (954 bp) resultieren. Auch mit der *opuE*-Sonde wurden zwei mRNA-Spezies detektiert, von denen die kleinere (1500 Basen) der Größe des *opuE*-Gens (1476 bp) entspricht. Die größere mRNA-Spezies entspricht dem Transkript aus *opuE* und dem stromabwärtsgelegenen Gen *sapB* (Spiegelhalter, 1999) (Abb. 22). Die Expression aller *opu*-Gene wird durch Hitzestress induziert (Abb. 23).

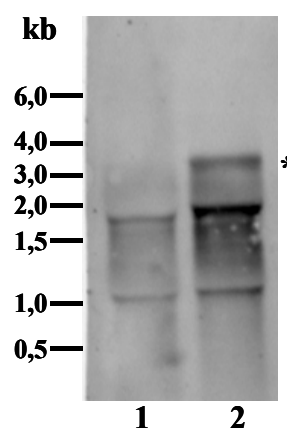
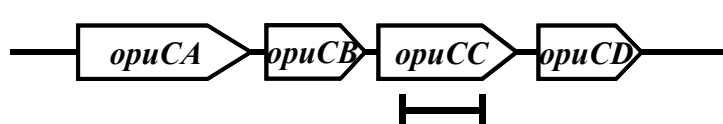
A



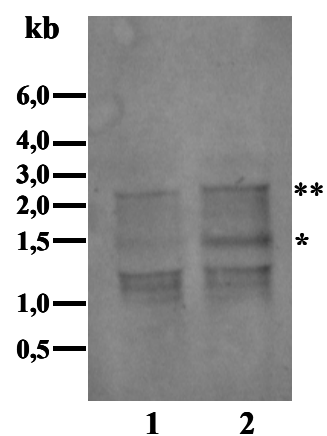
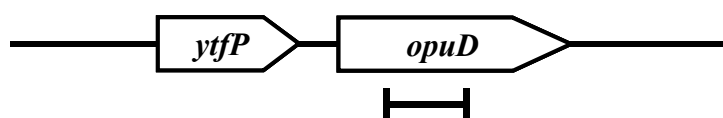
B

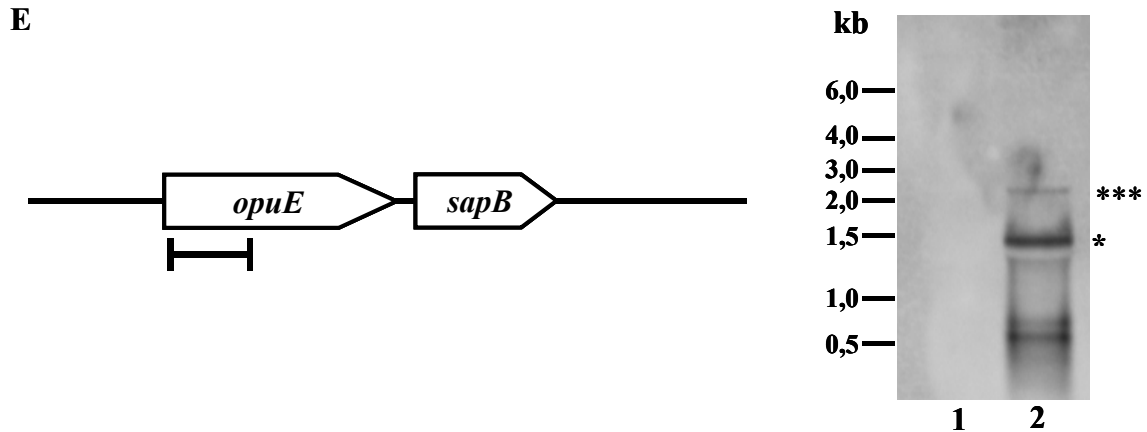


C



D



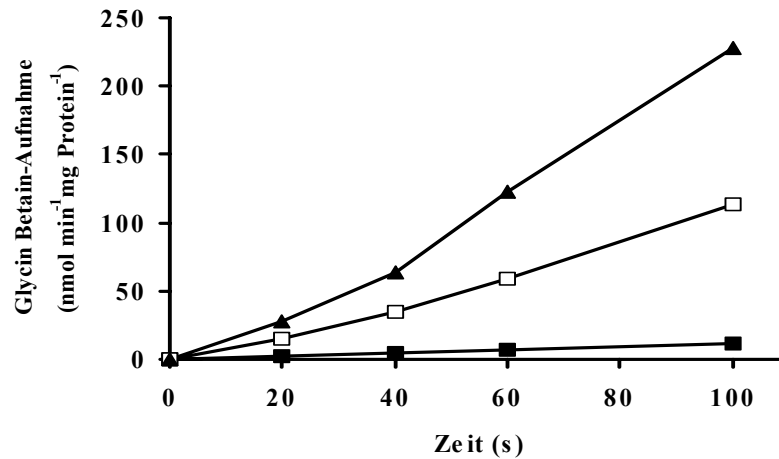


**Abb. 23: Northernblotanalysen der *opu*-Transkripte unter Hitzestress**

Dargestellt ist die genetische Organisation der *opuA* (A), *opuB* (B), *opuC* (C), *opuD* (D) und *opuE* (E) Region. Die Lage der verwendeten RNA-Sonden für die Detektion der Transkripte ist jeweils durch einen Balken markiert. Gesamt-RNA aus bei 37°C (jeweils Spur1) bzw. 52°C (jeweils Spur2) bis zur exponentiellen Phase kultivierten Zellen wurde extrahiert, auf MOPS-Agarosegelen aufgetrennt und mit DIG-markierten RNA-Sonden spezifisch für *opuA* (A), *opuB* (B), *opuC* (C), *opuD* (D) und *opuE* (E) hybridisiert. Die Signale, die jeweils der Größe des gesamten Operons (*opuA*, *opuB* und *opuC*) bzw. der einzelnen Transkriptionseinheit (*opuD* und *opuE*) entsprachen sind mit einem Stern (\*) markiert. Das größere Transkript im *opuD*-Northern (\*\*) lässt sich wahrscheinlich auf ein Durchlesen des stromaufwärts gelegenen Gens (*ytfP*) zurückführen. Das größere Signal (\*\*\*) im *opuE*-Northern besteht aus *opuE* und dem stromabwärts gelegenen *sapB* (Spiegelhalter, 1999).

## 2.6 Bestimmung der Glycin Betain-Aufnahme unter Hitzestress

Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsrate der *opu*-Gene bei 52°C gesteigert wird. Im folgenden sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Transportaktivität und der Glycin Betain-Pool durch Hitzestress beeinflusst werden. Zu diesem Zweck wurden Transporttests mit radioaktiv markiertem [1-<sup>14</sup>C]-Glycin Betain durchgeführt. Zur Bestimmung der Glycin Betain Aufnahmerate wurde *B. subtilis* bei 37°C bzw. 52°C bis zu einer OD<sub>578</sub> zwischen 0,5 und 0,8 kultiviert, ein Aliquot der Zellsuspension wurde entnommen und die Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain wurde bei der entsprechenden Temperatur in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.



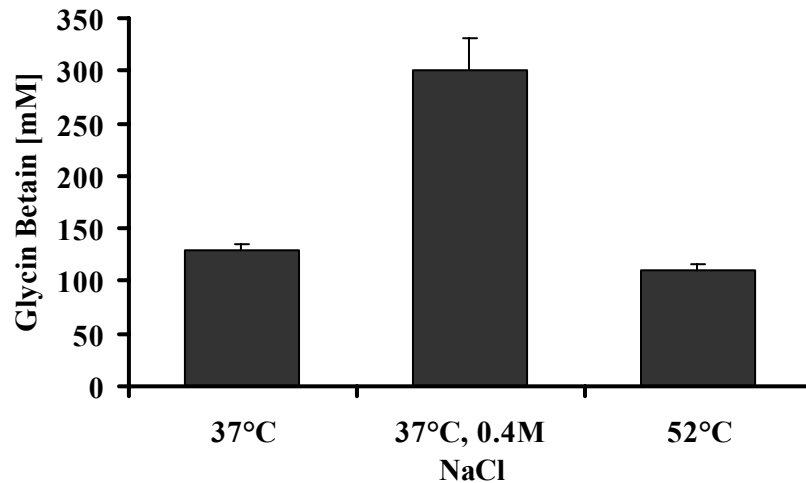
**Abb. 24: Bestimmung der Glycin Betain-Transportrate**

Dargestellt ist die Glycin Betain-Aufnahme (Substratkonzentration 10  $\mu$ M) in Abhängigkeit von der Zeit in *B. subtilis* Zellen, die bei 37°C (□), 52°C (■) und 37°C mit 0,4 M NaCl (▲) kultiviert wurden. Bei 37°C nimmt *B. subtilis* Glycin Betain mit einer Rate von 63  $\text{nmol min}^{-1}$  auf. Osmotischer Stress steigert die Aufnahmerate auf 128  $\text{nmol min}^{-1}$  und bei 52°C ist der Transport auf 7  $\text{nmol min}^{-1}$  reduziert.

Da bekannt ist, dass die Transportrate durch osmotischen Stress gesteigert wird, wurde zur Kontrolle eine Kultur vermessen, die bei 37°C in Anwesenheit von 0,4 M NaCl gewachsen war. Bei 37°C transportiert *B. subtilis* Glycin Betain mit einer Rate von 63  $\text{nmol min}^{-1}$ . Bei osmotischem Stress (0,4 M NaCl) wird der Transport gesteigert und Glycin Betain wird im Vergleich zu ungestressten Zellen etwa doppelt so schnell in die Zellen aufgenommen (128  $\text{nmol min}^{-1}$ ). Obwohl die Transkription der *opu*-Gene bei Hitzestress induziert wird, verläuft die Aufnahme von Glycin Betain bei 52°C deutlich verlangsamt. Die Transportrate ist hier mit 7  $\text{nmol min}^{-1}$  zehn mal geringer als in Zellen, die bei 37°C inkubiert wurden (Abb. 24).

Um der Frage nachzugehen, ob sich die verringerte Transportrate unter Hitzestress auch auf den Glycin Betain-Pool von *B. subtilis* Zellen bei 52°C auswirkt, wurde der Glycin Betain-Gehalt der Zellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu wurde *B. subtilis* aus einer Vorkultur in Minimalmedien mit 1 mM radioaktiv markiertem Glycin Betain inokuliert ( $\text{OD}_{578} = 0,1$ ) und bei 37°C, 37°C mit 0,4 M NaCl und 52°C bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,5 kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, auf Nitrocellulosefilter gesaugt, mit isotonischem Medium gewaschen und die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt. Daraus wurde die aufgenommene Glycin Betain-Menge errechnet und mit Hilfe des Zellvolumens von *B. subtilis* (Moses, 1999) auf die

Konzentration innerhalb der Zellen umgerechnet. Es stellte sich heraus, dass bei 37°C gewachsene Zellen 130 ( $\pm 5$ ) mM Glycin Betain akkumuliert hatten, während *B. subtilis* unter osmotischem Stress (0,4 M NaCl) einen Glycin Betain-Gehalt von 300 ( $\pm 30$ ) mM aufwies. Trotz der bei 52°C deutlich verringerten Transportrate akkumulierte *B. subtilis* unter diesen Bedingungen 110 ( $\pm 4$ ) mM Glycin Betain und hatte damit einen ähnlichen Gehalt wie ungestresste Zellen (Abb. 25).

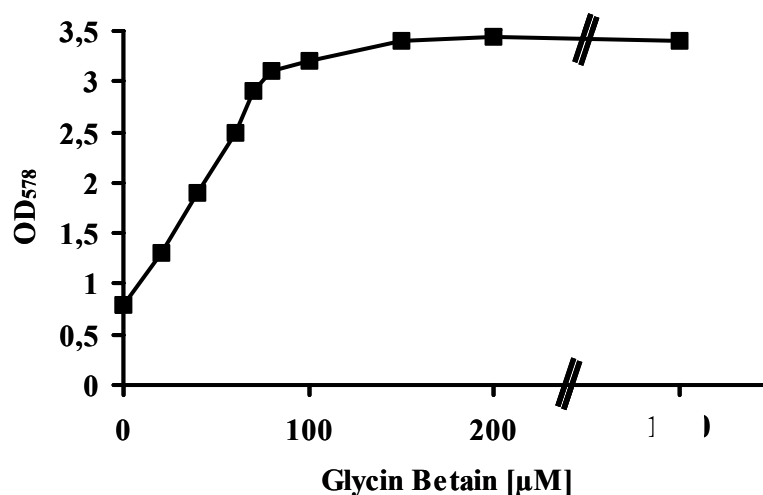


**Abb. 25: Glycin Betain-Gehalt von *B. subtilis* Zellen unter verschiedenen Bedingungen**

Dargestellt ist der Glycin Betaingehalt von *B. subtilis* Zellen, die bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert wurden. Bei 37°C gewachsene Zellen hatten einen Glycin Betain-Pool von 130 ( $\pm 5$ ) mM, während unter Salzstress (0,4 M NaCl) 300 ( $\pm 30$ ) mM Glycin Betain akkumuliert wurden. Bei 52°C hatte *B. subtilis* mit 110 ( $\pm 4$ ) mM einen ähnlichen Glycin Betain-Gehalt wie ungestresste Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

## 2.7 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven Glycin Betain-Konzentration

In den bisher vorgestellten Experimenten wurden die kompatiblen Solute zur Analyse ihrer thermoprotektiven Eigenschaften in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Verbindungen im natürlichen Habitat von *B. subtilis* – den oberen Schichten des Bodens – in dieser Konzentration vorkommen. Daher sollte die halbmaximale Konzentration von Glycin Betain ermittelt werden, die ausreicht, das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C zu fördern. Dazu wurde der *B. subtilis* Wildtyp JH642 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Glycin Betain (0-1 mM) kultiviert, das Wachstum wurde verfolgt und nach 13 Stunden die erreichte OD<sub>578</sub> bestimmt (Abb. 26).



**Abb. 26: Halbmaximale hitzeprotektive Glycin Betain-Konzentration**

Dargestellt ist die nach 12 stündiger Inkubation bei 52°C erreichte OD<sub>578</sub> von *B. subtilis*-Kulturen in Abhängigkeit vom Glycin Betaingehalt des Mediums.

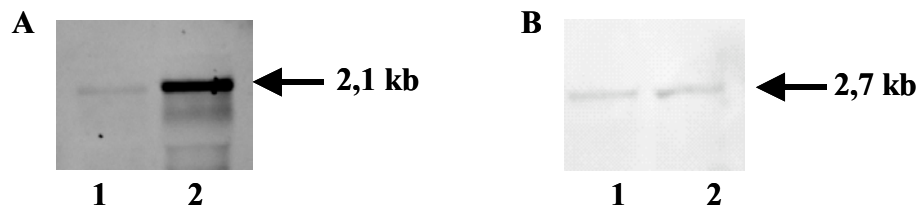
Wie aus Abb. 26 hervorgeht, wird das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C bereits durch das Vorhandensein von 20 µM Glycin Betain gefördert und schon eine Konzentration von 50 µM genügt, um die halbmaximale Hitzeprotektion zu erzielen.

## 2.8 Untersuchungen zur Beteiligung *de novo* synthetisierter Solute an der Hitzeadaptation von *B. subtilis*

Es konnte gezeigt werden, dass eine ganze Reihe kompatibler Solute das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C fördern, wenn sie extern im Medium zur Verfügung stehen. Aus anderen Organismen ist jedoch bekannt, dass unter Hitzestress kompatible Solute auch *de novo* synthetisiert werden, um ein Wachstum der Zellen unter diesen Bedingungen zu ermöglichen (Canovas *et al.*, 2001; Malin & Lapidot, 1996). In den bisher untersuchten Mikroorganismen handelte es sich hierbei in allen Fällen um das kompatible Solut, was auch bei osmotischem Stress von den Zellen *de novo* gebildet wird. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob *B. subtilis* als Antwort auf Hitzestress ebenfalls *de novo* kompatible Solute synthetisiert.

### 2.8.1 Northern Analyse der *proHJ* und *proBA* Transkripte

Stehen *B. subtilis* keine exogenen kompatiblen Solute zur Verfügung, so akkumuliert der Organismus als Antwort auf osmotischen Stress Prolin mittels *de novo* Synthese (Whatmore *et al.*, 1990). Hierfür steht dem Organismus neben dem Biosyntheseweg für anabole Zwecke (abhängig von den Enzymen ProB, ProA und ProI) ein separater Biosyntheseweg (abhängig von den Enzymen ProH, ProA und ProJ) zur Verfügung, dessen Expression unter osmotischer Kontrolle steht (Brill, 2001). Um zu überprüfen, ob diesem Biosyntheseweg auch bei Hitzestress eine Bedeutung zukommt, wurde zunächst die Expression der entsprechenden Gene unter Hitzestress analysiert. Zu diesem Zweck wurden Zellen bei 37°C und 52°C kultiviert und bei einer optischen Dichte von 1 geerntet, um die Gesamt-RNA zu isolieren. 3 µg (für den Nachweis des *proHJ*-Transkripts) bzw. 15 µg (für den Nachweis des *proBA*-Transkripts) dieser RNA wurden auf einem Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit *proHJ* bzw. *proBA*-spezifischen DIG-markierten RNA-Sonden hybridisiert. Die *proHJ*-Sonde lieferte ein Signal der Größe von 2,1 kb, was der Länge des *proHJ*-Transkripts entspricht. Die Expression von *proHJ* ist bei 52°C deutlich induziert (Abb. 27A). Die *proBA*-Sonde hybridisierte mit einer mRNA Spezies von 2,7 kb, was in der Größe mit dem *proBA*-Transkript mit regulatorischen Bereichen übereinstimmt (Abb. 27B). Die Transkriptionsrate von *proBA* ist offenbar unabhängig von der Temperatur.



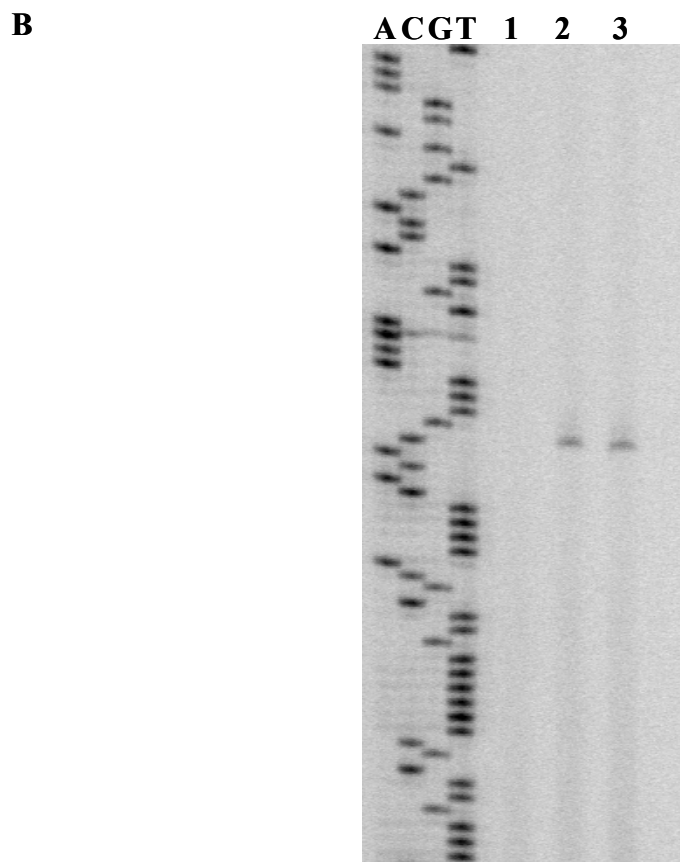
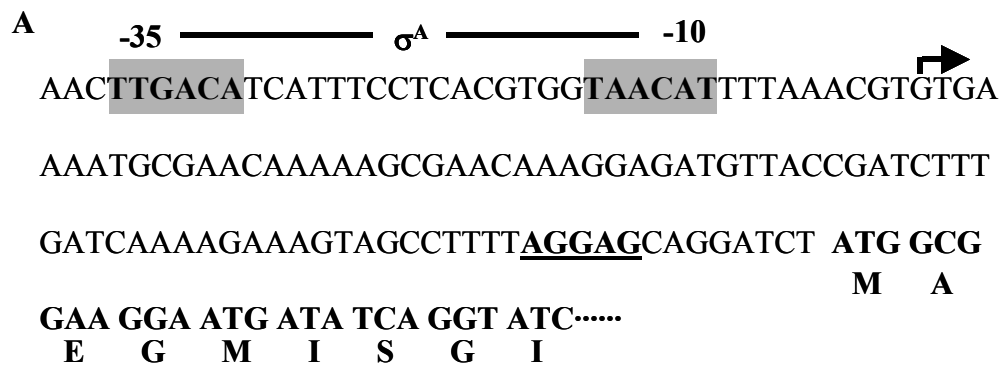
**Abb. 27: Northernblotanalyse der *proHJ*- und *proBA*-Transkripte**

3 µg (A) bzw. 15 µg (B) gesamt-RNA aus *B. subtilis* Zellen, die bei 37°C (jeweils Spur 1) und 52°C (jeweils Spur 2) kultiviert wurden, wurden auf einem Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit DIG-markierten RNA Sonden spezifisch für *proHJ* (A) und *proBA* (B).

### 2.8.2 Analyse des Startpunktes der *proHJ* mRNA

Um den unter Hitzestress genutzten Promotor zu identifizieren, wurde der stromaufwärts von *proH* liegende Transkriptionsstartpunkt mit Hilfe von Primer-Extension-Analysen identifiziert. Hierzu wurde RNA aus Zellen präpariert, die in SMM bei 37°C bzw. 52°C kultiviert wurden. Da der Startpunkt der *proHJ* mRNA unter Salzstress bereits bestimmt wurde (Brill, 2001), wurde zusätzlich RNA aus salzgestressten Zellen (0,6 M NaCl) in die Primer-Extension eingesetzt, um festzustellen, ob unter Hitzestress derselbe Promotor genutzt wird, wie bei osmotischem Stress. Für die Primer-Extension-Analyse wurde die RNA mit einem *proH*-spezifischen Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiert war, hybridisiert und mit Hilfe von AMV reverser Transkriptase wurde die entsprechende mRNA revers transkribiert. Unter Verwendung desselben Oligonukleotids wurde eine Sequenzreaktion auf dem Plasmid pJS13 durchgeführt, die als Größenstandard neben den Produkten der reversen Transkription auf einem Sequenzgel aufgetrennt wurde. Die reverse Transkription der RNA aus ungestressten *B. subtilis* Zellen lieferte kein Signal, während mit der RNA aus salz- bzw. hitzestressten Zellen jeweils eine cDNA-Spezies detektiert wurde. Diese cDNA entspricht in ihrer Länge dem Abstand vom verwendeten Oligonukleotid bis zum Transkriptionsstart. Damit liegt der Transkriptionsstartpunkt 86 bp stromaufwärts vom Startcodon von *proH* auf einem Guanin (Abb. 28). Im geeigneten Abstand stromaufwärts hierzu finden sich eine mögliche -10 und eine -35-Region, die Ähnlichkeiten zu den Konsensussequenzen  $\sigma^A$ -abhängiger Promotoren aufweisen (Helmann, 1995).





### Abb. 28: Primer-Extension Analyse des *proHJ*-Transkriptes

(A) Nukleotidsequenz der *proHJ*-Promotorregion. Der ermittelte Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil markiert und die als -10 und -35 Regionen gefundenen Sequenzabschnitte sind fettgedruckt und grau unterlegt. Die putative Ribosomenbindestelle ist fettgedruckt und unterstrichen. Der Anfang des kodierenden Bereichs von *proH* ist fettgedruckt dargestellt. (B) Jeweils 20  $\mu$ g RNA aus Zellen, die bei 37°C (Spur 1), 52°C (Spur 2) und 37°C mit 0,6 M NaCl (Spur 3) kultiviert wurden, wurden mit Hilfe der AMV reversen Transkriptase und eines IRD800 markierten, *proH*-spezifischen Oligonukleotids revers transkribiert und neben einer Sequenzreaktion, die mit demselben Oligonukleotid erhalten wurde, auf einem Sequenzgel aufgetrennt.

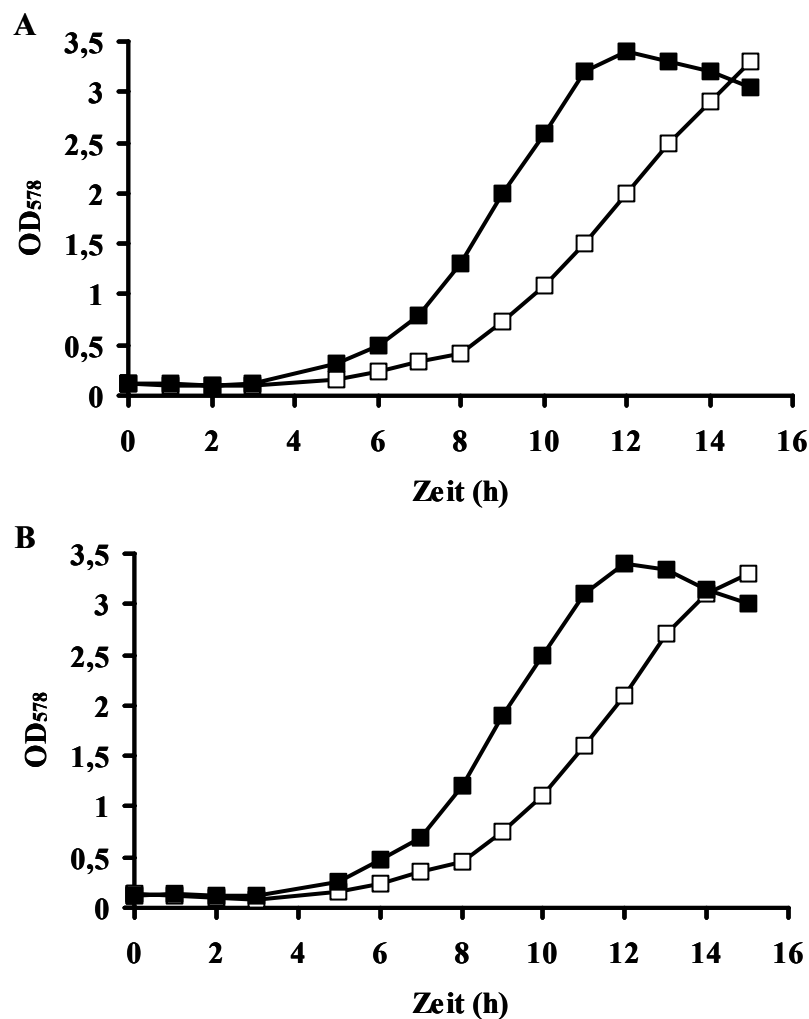
Damit erfolgt die Transkription von *proHJ* in *B. subtilis* unter Hitzestress ausgehend von demselben Promotor wie bei osmotischem Stress.

### 2.8.3 Charakterisierung des Phänotyps einer *proHJ*-Mutante bei Hitzestress

Die Analyse der Expression der *proHJ*-Gene unter Hitzestress ergab, dass die Transkriptionsrate dieser Gene bei 52°C im Vergleich zu 37°C deutlich gesteigert ist. Daher war es naheliegend zu untersuchen, ob die funktionelle Expression der *proHJ*-Gene für die Hitzetoleranz von *B. subtilis* von Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurde die Mutante JSB8 [ $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{neo})I$ ] (Brill, 2001), welcher der Prolinbiosyntheseweg für die osmotisch stimulierte Prolinakkumulation fehlt, näher analysiert. In einem einfachen Wachstumsexperiment wurde überprüft, ob die *ProHJ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in ihrem Wachstumsvermögen bei 52°C eingeschränkt ist. Dazu wurden Zellen des *B. subtilis* Wildtyps JH642 und der JSB8-Mutante bei 52°C in SMM gezogen und das Wachstum wurde über die Zeit verfolgt. Um parallel zu überprüfen, ob ein möglicher Wachstumsphänotyp der *ProHJ*-Mutante durch das Vorhandensein von 1 mM Glycin Betain ausgeglichen werden kann, wurden unter den gleichen Bedingungen JH642- und JSB8-Kulturen gezogen, denen 1 mM Glycin Betain zur Verfügung stand. Wie aus Abb. 29 hervorgeht, wuchs die JSB8-Mutante sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Glycin Betain bei 52°C vergleichbar wie der Wildtyp. Damit ist ausgeschlossen, dass die funktionelle Expression der *proHJ*-Gene essentiell für ein Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C ist.

Aus Untersuchungen in *Salmonella enterica* ist bekannt, dass moderater osmotischer Stress, der eine Akkumulation von Trehalose durch *de novo*-Synthese bewirkt, die Thermotoleranz des Organismus steigert (Canovas *et al.*, 2001). Daher stellte sich die Frage, ob eine Stimulation der Prolinakkumulation durch *de novo*-Synthese, ausgelöst durch osmotischen Stress, auch in *B. subtilis* das Wachstum unter Hitzestress fördert. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der *B. subtilis* Wildtyp JH642 in SMM mit und ohne 0,4 M NaCl bei 52°C kultiviert und das Wachstum wurde verfolgt. Unter diesen Bedingungen ließ sich zwischen den Zellen, die ohne bzw. mit moderatem osmotischen Stress gezogen wurden, kein Unterschied in der Wachstumsrate erkennen (Daten nicht gezeigt). Es bleibt offen, ob dieses Ergebnis dadurch zustande kam, dass das bei moderatem osmotischen Stress endogen akkumulierte Prolin keine hitzeprotektive Wirkung entfaltet oder ob die Enzyme des osmotisch stimulierten Prolinbiosyntheseweges möglicherweise bei 52°C in inaktiver Form

vorliegen und damit keine Prolinakkumulation stattfindet.



**Abb. 29: Wachstumsverhalten der ProHJ-Mutante (JSB8) bei 52°C**

Dargestellt sind Wachstumskurven des *B. subtilis* Wildtyps JH642 (A) und der ProHJ-Mutante JSB8 (B) bei 52°C in Abwesenheit (□) und Anwesenheit (■) von 1 mM Glycyl Betain.

#### 2.8.4 Bestimmung des zellulären Prolin- und Glutamat-Gehalts

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der *proHJ*-Gene zwar durch Hitze induziert wird, dass aber das Vorhandensein dieser Gene offenbar nicht essentiell für die Thermotoleranz von *B. subtilis* ist. Um nun herauszufinden, ob sich der Prolingehalt von *B. subtilis*-Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur ändert, wurde Glutamat (als

Substrat der Prolinsynthese) und Prolin in *B. subtilis*-Zellen mit Hilfe von HPLC-Analysen quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde der *B. subtilis* Wildtyp JH642 in SMM bei 37°C bzw. 52°C bis zu einer optischen Dichte von 1 inkubiert und geerntet. Der Prolin- und Glutamatgehalt der entsprechenden Zellextrakte wurde anschließend mittels HPLC-Analyse bestimmt. Es stellte sich heraus, dass der Glutamat-Gehalt von *B. subtilis* bei 37°C und bei 52°C - mit 378  $\mu\text{mol g}^{-1}$  Trockenzellen bei 37°C und 352  $\mu\text{mol g}^{-1}$  Trockenzellen bei 52°C - annähernd gleich ist. Die Prolinbestimmung ergab, dass *B. subtilis* bei 37°C etwa 5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  Trockenzellen Prolin enthält, während in Zellen, die bei 52°C kultiviert worden waren, kein Prolin detektierbar war (Tab. 10). Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen von ethanolischen Zellextrakten aus *B. subtilis*-Zellen, die bei 52°C gewachsen waren, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich dominante cytoplasmatische Osmolyte von bakteriellen Zellen nachweisen. *B. subtilis* wurde zu diesem Zweck in 1 l SMM bei 52°C bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{578}$  von 3 inkubiert, geerntet und extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden in einem Bruker 400 MHz NMR Spektrometer vermessen. Die Auswertung der erhaltenen Spektren bestätigte, dass *B. subtilis* bei 52°C offenbar kein Prolin akkumuliert (Daten nicht gezeigt).

Somit ließ sich, trotz der Induktion der Prolinsynthesegene unter Hitzestress, in *B. subtilis*-Zellen, die bei 52°C kultiviert wurden, keine Akkumulation dieser Aminosäure feststellen.

**Tab. 10:** Glutamat- und Prolingehalt von *B. subtilis* bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen

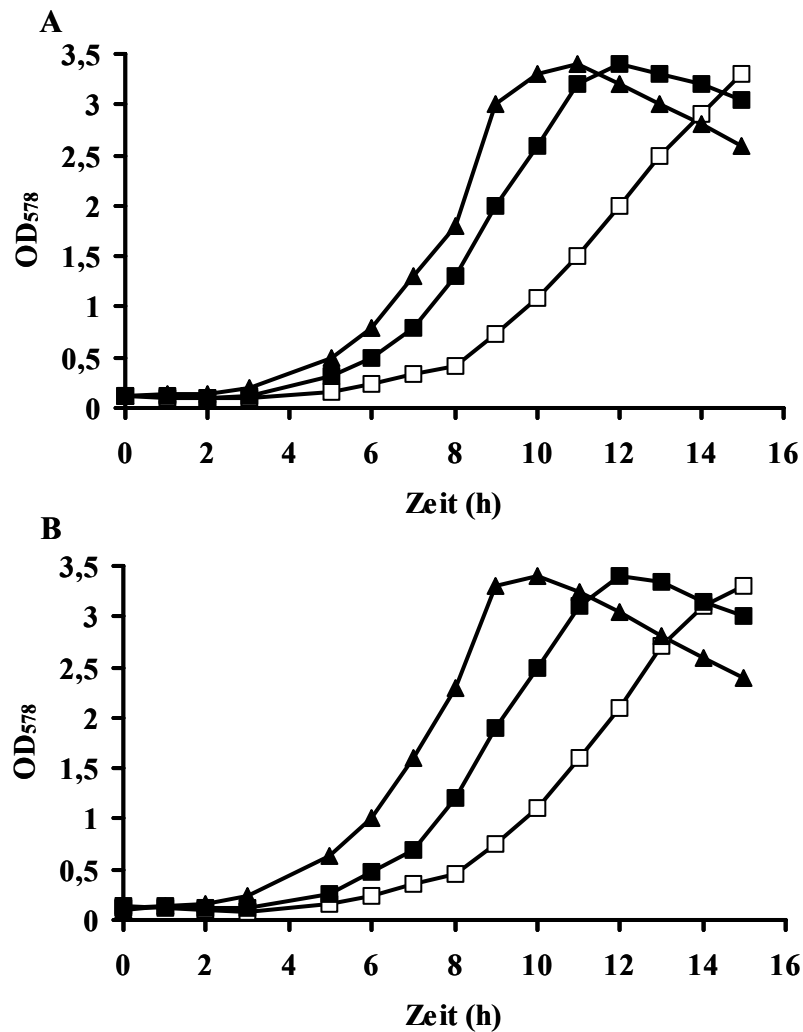
Wachstumstemperatur	Glutamat [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ TZ] <sup>a</sup>	Prolin [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ TZ] <sup>a</sup>
37°C	378 $\pm$ 7	4,7 $\pm$ 0,3
52°C	352 $\pm$ 5	nicht detektierbar

<sup>a</sup>: es wurden Zellextrakte von 3 unabhängigen Kulturen jeweils in Doppelbestimmung mittels HPLC vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

## 2.9 Glutamat fördert ebenfalls das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C

Bis auf Prolin waren alle kompatiblen Solute, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre hitzeprotektive Wirkung näher untersucht wurden, metabolisch inert. D.h., sie können von *B. subtilis* weder abgebaut, noch für anabole Zwecke verwertet werden. Neben den klassischen kompatiblen Soluten gibt es in *B. subtilis* noch eine Aminosäure, die dem Organismus bei osmotischem Stress einen deutlichen Wachstumsvorteil vermittelt, wenn sie exogen zur Verfügung steht: Glutamat. Da gezeigt werden konnte, dass der Organismus bei Hitzestress nahezu dieselben kompatiblen Solute nutzt, wie bei osmotischem Stress und bei der Aufnahme dieser Solute bei 52°C auch auf die selben Transportsysteme zurückgreift wie bei hoher Osmolarität, wurde auch der Effekt von Glutamat auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C näher charakterisiert. Zunächst wurde in einem einfachen Wachstumsexperiment der mögliche fördernde Effekt von Glutamat auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C untersucht. Wieder wurden Zellen des *B. subtilis* Wildtyps bei 52°C ohne bzw. mit Glycin Betain oder Glutamat kultiviert und das Wachstum wurde verfolgt. Es stellte sich heraus, dass auch Glutamat die lag-Phase der Zellen bei 52°C signifikant verkürzt und die Wachstumsrate  $\mu$  von 0,2 h<sup>-1</sup> auf 0,43 h<sup>-1</sup> steigert. Im Vergleich zur Wirkung von Glycin Betain ist der wachstumsfördernde Effekt von Glutamat sogar noch deutlicher (Abb. 30A).

In einem nächsten Experiment, sollte geklärt werden, ob der hitzeprotektive Effekt von Glutamat unter Umständen auf einer Umwandlung der Verbindung zu Prolin beruht. Dazu wurde das Wachstum der JSB8 Mutante, die Glutamat zu stressprotektiven Zwecken nicht mehr in Prolin umwandeln kann, bei 52°C in SMM ohne bzw. mit Glutamat bzw. Glycin Betain verfolgt. Auch hier zeigte sich dasselbe Bild wie bei dem Wildtyp: Glutamat vermittelt bei 52°C einen deutlichen Wachstumsvorteil, der sogar stärker ist als der Vorteil, der durch das Vorhandensein von GB vermittelt wird (Abb. 30B). Daher ist es naheliegend, dass Glutamat *per se* hitzeprotektiv wirkt und es nicht erforderlich ist, dass es zu diesem Zweck zunächst zu Prolin umgesetzt wird. Dieser Befund korreliert mit dem Ergebnis, dass bei 52°C kein *de novo* synthetisiertes Prolin nachgewiesen konnte (s. Abschnitt 2.8.4).



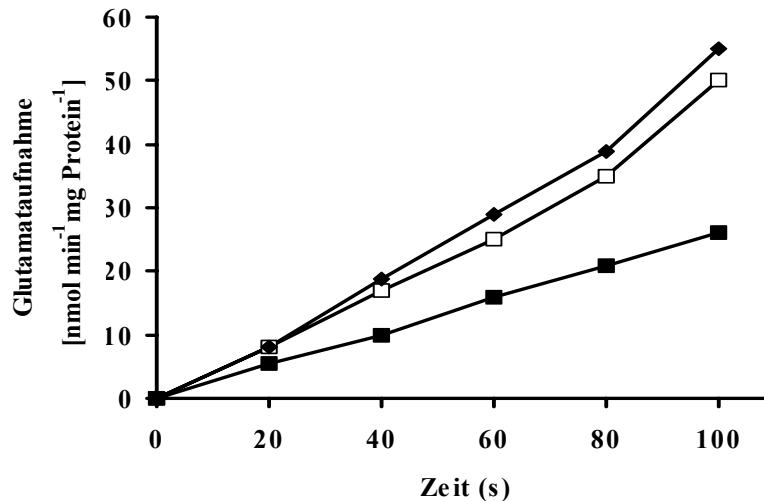
**Abb. 30: Hitzeprotektive Wirkung von Glutamat**

Dargestellt sind Wachstumskurven des *B. subtilis* Wildtyps JH642 (A) und des Stammes JSB8 [ $\Delta(proHJ::neo)I$ ] (B) bei 52°C in SMM ohne Zusatz (□), mit 1 mM Glycin Betain (■) und 1 mM Glutamat (▲). Das Experiment wurde drei mal wiederholt und es sind repräsentative Kurven gezeigt.

## 2.9.2 Bestimmung der Glutamat-Aufnahme

Um herauszufinden, ob die Glutamat-Aufnahme in *B. subtilis* bei 52°C im Vergleich zu 37°C gesteigert wird, wurde zunächst die Glutamat-Aufnahme mit Hilfe von radioaktiv markiertem  $[1-^{14}C]$ -Glutamat bestimmt. Zu diesem Zweck wurde *B. subtilis* unter verschiedenen Bedingungen (bei 37°C, bei 37°C mit 0,4 M NaCl und bei 52°C) in SMM bis zur exponentiellen Phase ( $OD_{578}$  0,5-0,8) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit radioaktiv markiertem Glutamat versetzt und die Glutamat-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei der entsprechenden Temperatur verfolgt.

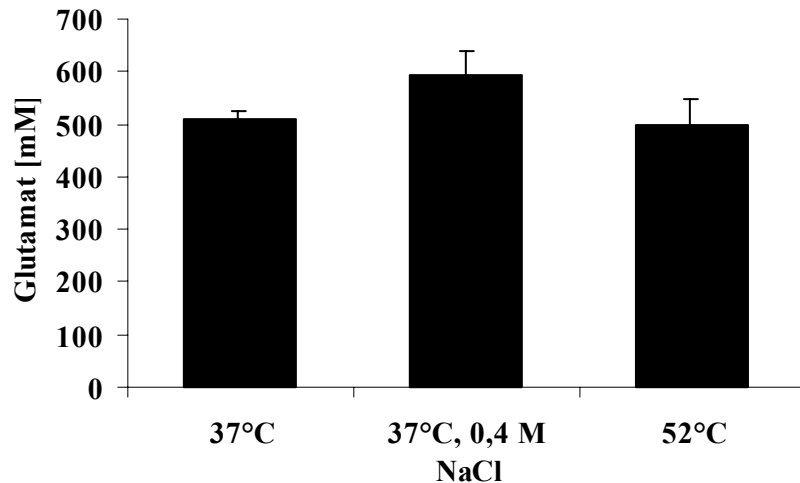
Ungestresste Zellen transportierten Glutamat mit einer Rate von  $27 \text{ nmol min}^{-1}$  und osmotischer Stress beeinflusste die Transportrate kaum ( $30 \text{ nmol min}^{-1}$ ). Unter Hitzestress wird Glutamat mit einer im Vergleich zu ungestressten Zellen um die Hälfte reduzierten Geschwindigkeit transportiert ( $15 \text{ nmol min}^{-1}$ ) (Abb. 31).



**Abb. 31: Glutamat-Aufnahme unter verschiedenen Bedingungen**

Dargestellt ist die Glutamat-Aufnahme (Substratkonzentration  $60 \mu\text{M}$ ) von *B. subtilis* Zellen, die bei  $37^\circ\text{C}$  (□),  $37^\circ\text{C}$  mit  $0,4 \text{ M NaCl}$  (◆) und bei  $52^\circ\text{C}$  (■) kultiviert wurden.

Zur Ermittlung des Glutamat-Pools wurde analog zur Ermittlung des Glycin Betain-Pools (s. Abschnitt 2.6) von *B. subtilis* vorgegangen. Der Pool wurde ebenfalls unter drei Bedingungen ( $37^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  mit  $0,4 \text{ M NaCl}$  und  $52^\circ\text{C}$ ) mit einer Endkonzentration von  $1 \text{ mM}$  radioaktiv markiertem Glutamat bestimmt. Wie aus Abb. 32 deutlich wird, ist der Glutamat-Pool der Zellen unter allen drei Bedingungen ähnlich. Bei  $37^\circ\text{C}$  akkumuliert *B. subtilis* Glutamat zu einer Konzentration von  $511 (\pm 15) \text{ mM}$ , während bei  $52^\circ\text{C}$   $499 (\pm 47) \text{ mM}$  Glutamat vorliegen. Osmotischer Stress führt lediglich zu einem leichten Anstieg des Glutamat-Gehaltes der Zellen auf  $595 (\pm 48) \text{ mM}$  (Abb. 32)



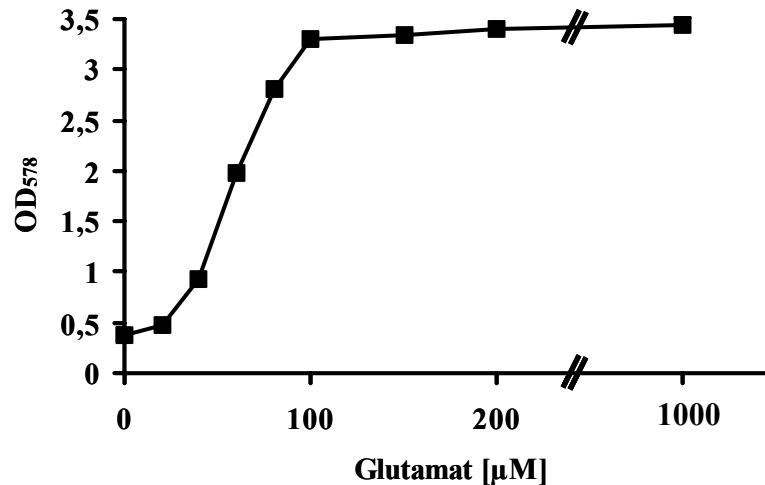
**Abb. 32: Glutamat-Gehalt von *B. subtilis* Zellen unter verschiedenen Bedingungen**

Dargestellt ist der Glutamat-Gehalt von *B. subtilis* Zellen, die mit 1 mM radioaktiv markiertem Glutamat unter den angegebenen Bedingungen bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,5 kultiviert wurden. Bei 37°C werden 499 ( $\pm$  47) mM, bei 37 °C unter moderatem osmotischen Stress 595 ( $\pm$  48) mM und bei 52°C 499 ( $\pm$  47) mM Glutamat aufgenommen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

### 2.9.3 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven Glutamatkonzentration

Zur Bestimmung der Glutamatkonzentration, die halbmaximale thermoprotektive Wirkung zeigt, wurde *B. subtilis* bei 52°C in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Glutamat (0-1 mM) kultiviert und der Wachstumsertrag wurde nach 11 Stunden bestimmt. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 40  $\mu$ M Glutamat schon leicht thermoprotektiv wirkt und etwa 60  $\mu$ M Glutamat ausreichen, um die maximale Hitzeprotektion zu bewirken (Abb. 33).





**Abb. 33: Halbmaximale hitzeprotektive Glutamatkonzentration**

Dargestellt ist die nach 11 Stunden Kultivierung bei 52°C erreichte OD<sub>578</sub> von *B. subtilis*-Kulturen in Abhängigkeit der im Medium vorhandenen Glutamat Konzentration. 60 µM Glutamat reichen aus, um halbmaximale Hitzeprotektion zu gewährleisten.

### 3. Untersuchungen zur Beteiligung des alternativen Sigmafaktors $\sigma^B$ bei der Adaptation an supraoptimale Wachstumsbedingungen

Im Zusammenhang mit der Anpassung von *B. subtilis* an widrige Umweltbedingungen ist das  $\sigma^B$ -Regulon gut charakterisiert (Hecker & Völker, 2001; Petersohn *et al.*, 2001). Der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$  wird durch eine Reihe von Stressfaktoren transient induziert und sorgt für die Expression zahlreicher Stressproteine, welche die Zelle mit einer multiplen Stressresistenz ausstatten (Völker *et al.*, 1999). Untersuchungen in *Listeria monocytogenes* führten zu dem Ergebnis, dass diesem Sigmafaktor eine einzigartige Rolle bei der Langzeitanpassung an niedrige Temperaturen zukommt (Becker *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu der sehr schnellen aber lediglich transienten Induktion, wie sie bei Stress ausgelöst z.B. durch Ethanol oder Nährstofflimitation auftritt, werden  $\sigma^B$ -abhängige Gene bei lange andauerndem Kältestress erst relativ spät induziert und die erhöhte Expression bleibt lange Zeit auf diesem Level (Becker *et al.*, 2000). Um der Frage nachzugehen, ob  $\sigma^B$  auch bei der Anpassung an Temperaturen oberhalb des Wachstumsoptimums eine besondere Rolle zukommt, wurden im Rahmen dieser Arbeit in *B. subtilis* erste Untersuchungen zur Expression  $\sigma^B$ -abhängiger Gene bei Langzeit-Hitzestress gemacht. Zu diesem Zweck wurde

*B. subtilis* bei 37°C und 52°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1 kultiviert und zur Isolation von Gesamt-RNA verwendet. Jeweils 4 µg dieser RNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt auf Membranen geblottet und mit Sonden spezifisch für die  $\sigma^B$ -abhängigen Gene *ctc* und *gsiB* hybridisiert. Mit beiden Sonden konnte jeweils eine mRNA-Spezies detektiert werden, die in ihrer Größe dem *ctc*-Transkript bzw. dem *gsiB*-Transkript (369 Nukleotide) entsprach. In beiden Fällen war die Expression der Gene bei 52°C im Vergleich zu 37°C deutlich induziert, obwohl die Zellen mehr als drei Generationen an die erhöhte Temperatur angepasst waren (Abb.34). Damit unterscheidet sich die Induktion bei Hitzestress von dem typischen  $\sigma^B$ -abhängigen Muster, bei dem  $\sigma^B$ -abhängige Gene nach dem Einwirken von Stress lediglich transient induziert werden. Um zweifelsfrei beweisen zu können, dass  $\sigma^B$  auch bei der Anpassung an supraoptimale Wachstumsbedingungen eine besondere Rolle zukommt, sind aber weitergehende Analysen unerlässlich.



**Abb. 34: Northernblot-Analysen von *gsiB* und *ctc***

*B. subtilis* JH642 wurde auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1 bei 37°C bzw. 52°C inkubiert und zur RNA-Isolation verwendet. Jeweils 4 µg der RNA aus Zellen, die bei 37°C (Spur1) bzw. 52°C (Spur2) kultiviert wurden, wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Membranen übertragen und mit Sonden spezifisch für *gsiB* (A) und *ctc* (B) hybridisiert. Die Detektion der Signale erfolgte auf einem Phosphorimager.

## V. DISKUSSION

Kompatible Solute wurden erstmals in Zusammenhang mit der Osmostressantwort von Organismen identifiziert und ihnen wurde lange Zeit die ausschließliche Funktion als osmotische Schutzsubstanzen zugesprochen. In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass kompatible Solute auch einen Schutz vor anderen Stressfaktoren (z.B. hohe oder niedrige Temperatur oder Austrocknung) vermitteln und damit kommt ihnen eine viel globalere Rolle bei der Anpassung von Organismen an widrige Bedingungen zu (Welsh, 2000).

Um eine effektive Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt zu gewährleisten, sind Organismen auf spezifische Transportsysteme angewiesen. Diese Aufnahmesysteme sind im Reich der Bacteria gut charakterisiert und den meisten untersuchten Bakterien stehen sowohl sekundäre Transporter zur Akkumulation dieser Verbindungen zur Verfügung als auch primäre, die zur Familie der ABC-Transporter zählen (Bremer & Krämer, 2000; Csonka & Epstein, 1996; Kempf & Bremer, 1998b; Sleator & Hill, 2002). In Archaea ist jedoch bislang erst ein einziges Aufnahmesystem für Glycin Betain auf molekularer Ebene identifiziert worden (Roessler *et al.*, 2002). Um weitere Einblicke in die Aufnahme kompatibler Solute in Archaea zu erlangen, war die Charakterisierung eines Transportsystems für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *A. fulgidus* Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass *A. fulgidus* zur Aufnahme von Glycin Betain und Prolin Betain ein hochaffines Bindeprotein-abhängiges Transportsystem zur Verfügung steht. Somit wurde erstmals ein Transportsystem zur Aufnahme kompatibler Solute in einem hyperthermophilen Archaeon identifiziert und charakterisiert. Physiologische Untersuchungen in *A. fulgidus* ergaben, dass dieser Organismus Glycin Betain und Prolin Betain widererwarten nicht als Osmoprotektiva nutzt, sondern beiden kompatiblen Soluten eine Rolle bei der Thermoprotektion dieses hyperthermophilen Archaeons zukommt.

### 1. ProU ist ein Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter

In der Genomsequenz von *A. fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) findet sich ein Gencluter (bestehend aus den Genen *proX*, *proV*, *proW2* und *proW1*), dessen abgeleitete Proteinsequenzen deutliche Sequenzidentitäten zu Untereinheiten von ABC-Transportern für

kompatible Solute aus zahlreichen Mikroorganismen aufweisen. In Analogie zu dem Glycin Betain-Aufnahmesystem ProU aus *E. coli* wurde dieses Gencluster ebenfalls als „*proU*“ annotiert (Klenk *et al.*, 1997).

ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembranproteinen, welche die Translokation der Substrate über die Membran vermitteln und einer ATPase als energetisierende Untereinheit (Higgins, 1992, Locher *et al.*, 2002). Zur Aufnahme von Substraten aus der Umgebung rekrutieren viele ABC-Transporter zudem ein extrazelluläres Substratbindeprotein, das entweder frei im Periplasma diffundiert oder – in Mikroorganismen ohne äußere Membran – in der Cytoplasmamembran verankert ist (Tam & Saier, 1993).

Das erste Gen des *proU*-Clusters codiert ein Polypeptid, das die charakteristische Signalsequenz extrazellulärer Proteine aufweist (Fekkes & Driessen, 1999) und zudem signifikante Sequenzidentitäten zu OtaC, dem putativen Bindeprotein des Glycin Betain-Transporters Ota aus *Methanosarcina mazei*, zeigt. Die Charakterisierung des heterolog exprimierten und gereinigten ProX im Rahmen dieser Arbeit belegte, dass es sich um das Bindeprotein des Transporters handelt. Stromabwärts von *proX* findet sich der offene Leserahmen *proV*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Walker-Motive aufweist (Walker *et al.*, 1982). Diese Motive sind charakteristisch für Nukleotid-bindende Proteine und das zweite Gen des Clusters codiert damit eine ATPase. Zudem findet sich im *proU*-Cluster die genetische Information für ProW1 und ProW2, die beide ausgesprochen hydrophob sind und die Membran aufgrund von Topologieberechnungen jeweils fünf mal durchspannen. Daher ist es naheliegend, dass ProW1 und ProW2 als Transmembrankomponenten dienen. Das ProU-Aufnahmesystem zeigt damit den Aufbau eines typischen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporters.

### 1.1 ProX – ein Bindeprotein für Glycin Betain und Prolin Betain

Untersuchungen der Maltose-Bindeproteine aus den hyperthermophilen Organismen *Thermotoga maritima* und *Thermococcus litoralis* zeigten, dass die aus den entsprechenden Organismen nativ gereinigten Bindeproteine dieselben Eigenschaften aufweisen, wie die in *E. coli* heterolog überexprimierten (Horlacher *et al.*, 1998; Wassenberg *et al.*, 2000). Für ProX aus *A. fulgidus* wurde daher ebenfalls die heterologe Überproduktion in *E. coli* gewählt, um genügend Material zur Bestimmung der Substratspezifität und Ermittlung der kinetischen

Parameter des Bindeproteins zu erhalten. Die heterologe Überexpression lieferte funktionelles Protein, das zur apparenten Homogenität gereinigt wurde (Abb. 5).

Die Bindeproteine der ABC-Transporter ProU aus *E. coli* und OpuA aus *B. subtilis*, die zur Akkumulation kompatibler Solute dienen, binden Glycin Betain und Prolin Betain (Haardt *et al.*, 1995; Kempf *et al.*, 1997). In dieser Hinsicht gleicht ProX aus *A. fulgidus* seinen Pendanten aus *E. coli* und *B. subtilis* (Abb. 6). Auffallend ist jedoch die vergleichsweise hohe Affinität, die ProX aus *A. fulgidus* für beide Substrate aufweist. Während ProX aus *E. coli* und OpuA aus *B. subtilis* eine  $K_D$  von 1,4  $\mu\text{M}$  bzw. 6  $\mu\text{M}$  für Glycin Betain zeigen (Haardt *et al.*, 1995; Kempf *et al.*, 1997), bindet ProX aus *A. fulgidus* seine Substrate mit Affinitätskonstanten von 60 nM (Glycin Betain) bzw. 50 nM (Prolin Betain). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Bestimmung der kinetischen Parameter unter Verwendung unterschiedlicher Methoden erfolgte (Haardt *et al.*, 1995; Kempf *et al.*, 1997). Derartige Unterschiede in der Affinität Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter zwischen mesophilen Bakterien und hyperthermophilen Archaea wurden allerdings auch schon für verschiedene Zucker-Aufnahmesysteme beschrieben (Albers *et al.*, 2001). Führt man sich vor Augen, dass hyperthermophile Archaea häufig in oligotrophen Habitaten, wie z.B. hydrothermalen Quellen, vorkommen, ist diese hohe Affinität der Transporter vermutlich eine Voraussetzung für die erfolgreichen Besiedlung solcher Lebensräume.

## 1.2 Temperaturverhalten von ProX

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass ProX Glycin-Betain bereits bei 25°C bindet und selbst bei einer 30-minütigen Inkubation bei 100°C noch nicht inaktiviert wird (Abb. 7). Eine derartige Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch hohe Temperaturen wurde auch für das Maltose-Bindeprotein aus *Thermotoga maritima* (Wachstumsoptimum 80°C) gezeigt, das selbst bei einer zweistündigen Inkubation bei 100°C keine Anzeichen thermischer Denaturierung aufweist (Wassenberg *et al.*, 2000). Die Eigenschaften, die zur Hitzestabilität von Proteinen hyperthermophiler Organismen beitragen, wurden weitgehend untersucht. Vergleiche von Proteinen hyperthermophilen Ursprungs mit ihren Pendanten aus mesophilen zeigten, dass die Unterschiede, die zur Thermostabilität der Proteine führen, lediglich marginal sind. So gibt es z.B. Unterschiede in der Aminosäuresequenz mit der Tendenz, dass in thermostabilen Proteinen bevorzugt geladene Aminosäuren vorkommen. Damit haben thermostabile Proteine die Möglichkeit, vergleichsweise viele Salzbrücken

ausbilden, was zur intrinsischen Stabilisierung beiträgt. (Sternier & Liebl, 2001; Szilagyi & Zavodszky, 2000). Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von ProX aus *A. fulgidus* mit der der Glycin Betain-Bindeproteine OtaC aus *Methanosarcina mazei* (Identität auf Proteinebene 55 %) und OpuCC aus *B. subtilis* (Identität auf Proteinebene 33 %) und anderen Glycin Betain-Bindeproteinen mit geringerer Sequenzidentität führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. So weist ProX aus *A. fulgidus* zwar im Vergleich zu OtaC aus *M. mazei* 30 % mehr geladenen Aminosäuren auf, zwischen OpuCC aus *B. subtilis* und ProX gibt es aber in dieser Hinsicht nur vernachlässigbare Unterschiede. Allein aufgrund der Primärstruktur lassen sich also keine greifbaren Ursachen für die Thermostabilität von ProX ausmachen.

Vergleiche von Kristallstrukturen von Proteinen aus mesophilen und hyperthermophilen Organismen ergaben, dass in thermostabilen Proteinen die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter häufig länger ausfallen, während die nicht definiert strukturierten Bereiche reduziert sind. Das steigert die Anzahl von Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat, was wiederum für eine Stabilisierung verantwortlich gemacht wird (Jaenicke & Böhm, 1998). Insgesamt ist die Struktur hitzestabiler Proteine kompakter und die intramolekularen Zwischenräume sind im Vergleich zu den jeweiligen mesophilen Equivalenten reduziert (Szilagyi & Zavodszky, 2000). Da die Kristallstruktur von ProX aus *A. fulgidus* erst kurz vor der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand, stehen Untersuchungen zu strukturellen Ursachen für die Thermostabilität dieses Proteins noch aus.

Die Tatsache, dass ProX seine Substrate bereits bei mesophilen Temperaturen bindet, scheint interessant, da die Flexibilität von Proteinen hyperthermophilen Ursprungs bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen häufig eingeschränkt ist und die Bindung von Substraten durch Bindeproteine oftmals eine deutliche Konformationsänderung voraussetzt (Sharff *et al.*, 1992; Shilton *et al.*, 1996). Im Einklang mit den Befunden zum Temperaturverhalten von ProX bindet auch das Maltose-Bindeprotein aus *T. maritima* sein Substrat bei niedrigen Temperaturen (Horlacher *et al.*, 1998). Nähere Untersuchungen ergaben jedoch, dass lediglich die Assoziation des Substrates an das Bindeprotein bei allen Temperaturen gleich schnell verlief. Die Dissoziation der Maltose von dem Bindeprotein war dagegen deutlich temperaturabhängig, so dass sie bei 82°C in weniger als drei Sekunden erfolgte, während bei 22°C 50 Sekunden benötigt wurden (Diez *et al.*, 2001). In ProX aus *A. fulgidus* verliefen dagegen Assoziation und Dissoziation von Glycin Betain sowohl bei 25°C als auch bei 100°C sehr schnell (weniger als 5 Sekunden) (Abb. 7). Mögliche Ursachen für dieses unterschiedliche Temperaturverhalten der beiden Bindeproteine könnten auf der einen Seite in der Art der Substratbindung begründet sein, da die Bindung von Glycin Betain an

ProX überwiegend über Kation- $\pi$ -Interaktionen vermittelt wird (Abb. 13), während die Trehalose im Trehalosebindeprotein hauptsächlich über Wasserstoffbrücken koordiniert wird (Diez *et al.*, 2001). Zum anderen ist es denkbar, dass die Konformationsänderung, die zum Freisetzen des Substrates notwendig ist, in ProX weniger Energie erfordert als im TMBP aus *T. litoralis*. Um dieser Frage nachzugehen wären Untersuchungen in Hinblick auf die Thermodynamik der Substratbindung nötig.

### 1.3 Struktur von ProX aus *A. fulgidus*

Bisher existierte lediglich eine Kristallstruktur eines Glycin Betain-Bindeproteins, die Aufschluss über die Art der Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain an das Protein gibt (Breed *et al.*, 2001, Schiefner *et al.*, in Vorbereitung). In der Bindetasche dieses Bindeproteins (ProX aus *E. coli*) finden sich drei Tryptophane, die Box-förmig um das Substrat Glycin Betain bzw. Prolin Betain angeordnet sind. Es ist bekannt, dass aromatische Aminosäurereste über ihre delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme mit positiv geladenen Verbindungen Kation- $\pi$ -Interaktionen ausbilden können (Dougherty, 1996). Die Bindung der Substrate wird demnach in ProX über Kation- $\pi$ -Interaktionen zwischen dem positiv geladenen Stickstoff der Substrate und den Tryptophanresten vermittelt (Schiefner *et al.*, in Vorbereitung), was auch über Mutagenesestudien bestätigt werden konnte (Bösser, 2001). Im Rahmen dieser Studien stellte sich heraus, dass sich die Tryptophane der sogenannten „Trp-Box“ auch durch andere aromatische Aminosäuren ersetzen lassen, ohne dass die Affinität für die Substrate signifikant reduziert wird. Voraussetzung für eine effektive Bindung des Substrats ist also ausschließlich das Vorhandensein delokalisierte  $\pi$ -Elektronensysteme an entsprechenden Positionen, die auch durch andere aromatische Aminosäuren gestellt werden können.

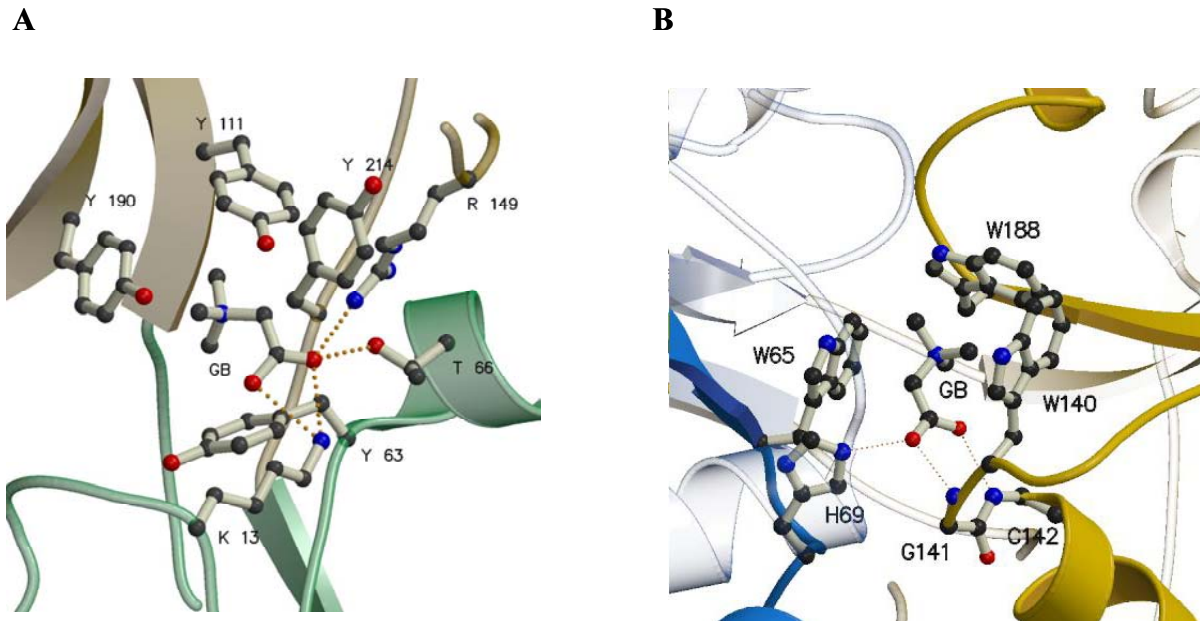
Vergleiche der Aminosäuresequenz verschiedener Glycin Betain-Bindeproteine zeigen eine deutliche Konservierung der „Trp-Box“, wobei in einigen Bindeproteinen die Tryptophane an den relevanten Positionen durch andere aromatische Aminosäure ersetzt sind (L. Bösser, Universität Marburg, pers. Mitteilung). Das legt nahe, dass die Substratbindung auch in anderen Glycin Betain-Bindeproteinen über Kation- $\pi$  Interaktionen vermittelt wird.

Im Rahmen einer Kooperation mit André Schiefner aus der Arbeitsgruppe von Prof. W. Welte in Konstanz konnte auch die Struktur von ProX aus *A. fulgidus* gelöst werden. Dabei wurde ProX von mir heterolog überproduziert und gereinigt und die Kristallisation und Lösung der

Kristallstruktur wurde von A. Schiefner durchgeführt. Die Faltung von ProX aus *A. fulgidus* ist nahezu identisch mit der von ProX aus *E. coli* und es zeigte sich, dass die Bindung von Glycin Betain tatsächlich auch in diesem Protein über Kation- $\pi$ -Interaktionen vermittelt wird. In der Bindetasche von ProX aus *A. fulgidus* finden sich vier Tyrosinreste (Tyr 63, Tyr 111, Tyr 190 und Tyr 214), die an der Bindung von Glycin Betain beteiligt sind. Dabei sind die Reste 63, 111 und 190 an der Ausbildung von Kation- $\pi$ -Interaktionen beteiligt, während der Tyrosinrest 214 nur dann an der Bindung von Glycin Betain beteiligt ist, wenn das Substrat in einer anderen Konformation vorliegt (A. Schiefner, Universität Konstanz, pers. Mitteilung). Zusätzlich wird die Carboxylatgruppe des Substrates durch Wasserstoffbrücken mit dem Lysinrest 13, dem Threoninrest 66 und dem Argininrest 149 koordiniert. Außer den über die „Trp“-Box vermittelten Kation- $\pi$ -Interaktionen wird Glycin Betain in ProX aus *E. coli* ebenfalls über Wasserstoffbrücken gebunden (Schiefner *et al.*, in Vorbereitung) und damit wird die Bindung von Glycin Betain sowohl in ProX aus *A. fulgidus* als auch in seinem mesophilen Pendant aus *E. coli* über dieselben Wechselwirkungen vermittelt (Abb. 35). Obwohl die beiden Glycin Betain-Bindeproteine aus nicht verwandten Organismen stammen, zeigen sie signifikante Übereinstimmung in Faltung und Substratbindung.

ProX aus *A. fulgidus* ist das erste Beispiel, in dem die Kation- $\pi$ -Interaktionen mit einem Substrat über eine „Tyr-Box“ vermittelt werden. In ProX aus *E. coli* wird die Bindung von Glycin Betain dagegen von einer „Trp-Box“ vermittelt (Schiefner *et al.*, in Vorbereitung). Diese von unterschiedlichen aromatischen Aminosäuren vermittelten Kation- $\pi$ -Interaktionen liefern neben den Mutagenesestudien (Bösser, 2001) einen weiteren Beleg dafür, dass diese Art von Wechselwirkungen von verschiedenen aromatischen Aminosäuren ausgehen kann.





**Abb. 35: Vergleich der an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste in ProX aus *A. fulgidus* und ProX aus *E. coli***

Dargestellt sind Detailansichten der Substratbindetaschen von ProX aus *A. fulgidus* (A) und ProX aus *E. coli* (B), in denen die Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, hervorgehoben sind. In ProX aus *A. fulgidus* wird das Substrat über die Tyrosinreste an den Positionen 63, 111, 190 über Kation- $\pi$ -Interaktionen und zusätzlich über drei Wasserstoffbrücken von Lysin 13, Threonin 65 und Arginin 149 koordiniert. In ProX aus *E. coli* wird die Bindung auf nahezu identische Weise vermittelt. Hier wird das Substrat über Kation- $\pi$ -Interaktionen ausgehend von den Tryptophanresten 65, 140 und 188 und ebenfalls drei Wasserstoffbrücken mit den Resten Histidin 69, Glycin 141 und Cystein 142 koordiniert. Die Abbildung wurde von A. Schiefner zur Verfügung gestellt.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz von ProX aus *A. fulgidus* mit den nah verwandten Glycin Betain-Bindeproteinen OtaC aus *M. mazei* (Sequenzidentität 55%) und OpuCC aus *B. subtilis* (Sequenzidentität 33%), so zeigt sich, dass die im ProX aus *A. fulgidus* an der Bindung beteiligten Tyrosine in allen drei Proteinen konserviert sind (Abb. 36). Das legt nahe, dass die Bindung des Substrates auch in diesen Proteinen über eine „Tyr-Box“ vermittelt werden könnte.

**Abb. 36: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Glycin Betain Bindeproteine**

Dargestellt ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen der Glycin Betain-Bindeproteine ProX aus *A. fulgidus*, OtaC aus *M. mazei*, OpuCC aus *B. subtilis* und ProX aus *E. coli*. Die im ProX aus *A. fulgidus* an der Bindung beteiligten Tyrosine und entsprechenden Aminosäuren in den anderen Bindeproteinen sind rot umrahmt und mit einem Pfeil markiert.

Die Tryptophane, die in ProX aus *E. coli* an der Bindung von Glycin Betain beteiligt sind, alignen bei dem verwendeten Algorithmus (Clustal W) nicht mit den relevanten Tyrosinen von ProX aus *A. fulgidus* (Abb. 36). Vergleiche der beiden Kristallstrukturen ergaben jedoch, dass die Tyrosinreste 63 und 190 des *A. fulgidus*-ProX den Tryptophanresten 65 bzw. 188 des *E. coli*-ProX entsprechen. Für das Tryptophan 140 aus dem *E. coli*-ProX gibt es kein Equivalent in dem ProX aus *A. fulgidus*, da der loop, der an dieser Stelle in dem ProX aus *E. coli* in die Bindetasche eintritt, in ProX aus *A. fulgidus* nicht vorhanden ist. Die Funktion des Trp 140 wird in ProX aus *A. fulgidus* von Tyr 111 übernommen (A. Schiefner, Universität Konstanz, pers. Mitteilung).

#### 1.4 ProX ist vermutlich ein Lipoprotein

In Gram-negativen Bacteria sind Substratbindepoteine im Periplasma zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran lokalisiert und diffundieren frei in diesem Raum. Gram-positiven Bacteria fehlt eine äußere Membran und Bindeproteine von ABC-Transportern sind daher über eine aminoterminal Lipidmodifikation in der Cytoplasmamembran verankert, damit sie nicht in das umgebende Medium verloren gehen (Sutcliffe & Russel, 1995). Archaeelle Cytoplasmamembranen bestehen aus Phytanylether-Lipiden, wobei die gegenüberliegenden polaren Kopfgruppen kovalent verknüpft sein können (Kates, 1993). Zusätzlich sind die Zellen von einer „S-layer“ umgeben. Damit ist die Situation in Archaea ähnlich wie in Gram-positiven Bacteria und es stellt sich die Frage, auf welche Weise Bindeproteine hier vor einem Verlust in das Medium geschützt werden. Prinzipiell sind zwei Arten der Verankerung von Bindeproteinen in der Cytoplasmamembran von Archaea denkbar. Zum einen finden sich in Archaea einige Bindeproteine, welche die charakteristische Signalsequenz sekretorischer Lipoproteinvorläufer aufweisen (Fekkes & Driessen, 1999) und die daher genau wie in Gram-positiven Bacteria über eine aminoterminal Lipidmodifikation in der Membran verankert werden (Horlacher *et al.*, 1998; Mattar *et al.*, 1994). Aufgrund des unterschiedlichen Membranaufbaus ist wahrscheinlich, dass sich die Art der Lipidmodifikation in Archaea von der in Bacteria unterscheidet. So deuten massenspektrometrische Untersuchungen des archaeellen Lipoproteins Halocyanin darauf hin, dass es sich bei der aminoterminalen Modifikation wahrscheinlich um ein C<sub>20</sub>-Phytanylether-Lipid handelt (Mattar *et al.*, 1994).

Erst kürzlich beschrieben Albers *et al.* (1999) eine neuartige Art der Verankerung von Bindeproteinen in der Membran von Archaea. Sie charakterisierten ein Glucose-Bindeprotein

aus *Sulfolobus solfataricus*, das bei seinem Transport über die Membran am Aminoterminal offenbar hinter der zwölften Aminosäuren gespalten wird. Direkt hinter der Spaltstelle findet sich in der Aminosäuresequenz eine putative Transmembranhelix, so dass die Autoren von einer Verankerung des Bindeproteins über ein Transmembransegment ausgehen. Datenbankanalysen sprechen für eine weite Verbreitung dieser Art von Verankerung in Archaea (Albers *et al.*, 1999).

Mit Hilfe von Westernblot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass ProX in *A. fulgidus* ebenfalls membranassoziiert vorliegt (Abb. 10). Eine Analyse der aminoterminalen Sequenz zeigte nicht die typischen Charakteristika der durch ein Membransegment verankerten Bindeproteine, sondern eine Sequenz von 18 Aminosäuren, welche mit ihren positiv geladenen Resten innerhalb der ersten fünf Aminosäuren und dem hydrophoben Core die Charakteristika der Signalsequenz sekretorischer Lipoproteinvorläufer aufweist (Fekkes & Driessen, 1999). Am Carboxyterminus der Signalsequenz findet sich eine Folge von Aminosäuren (Leu, Ala, Ala, Cys), die von der Signalpeptidase II als Spaltstelle erkannt wird. Normalerweise werden Lipoproteinvorläufer an einem aminoterminalen Cystein acyliert und dann von der Signalpeptidase II gespalten, um eine Verankerung des Proteins in der Membran zu ermöglichen (Fekkes & Driessen, 1999). Um mit Gewissheit sagen zu können, dass die aufgrund der Konsensussequenz vorhergesagte Spaltstelle in *A. fulgidus* tatsächlich genutzt wird, hätte ProX nativ gereinigt werden und eine Bestimmung der aminoterminalen Sequenz stattfinden müssen. Da davon auszugehen ist, dass Archaea eine der Signalpeptidase II ähnliche Protease zur Prozessierung des Lipoproteinvorläufers rekrutieren (Albers *et al.*, 1999), gäbe es zudem die Möglichkeit die Prozessierung von Prolipoproteinen zu Apolipoproteinen mit Hilfe des Peptidantibiotikums Globomycin (Inukai *et al.*, 1978) zu unterbinden und durch die Darstellung des nicht vollständig prozessierten pro-ProX zu beweisen, dass es sich tatsächlich um ein Lipoprotein handelt.

Der Anteil von ProX am Zellprotein von *A. fulgidus* beträgt  $2 \mu\text{g mg}^{-1}$ . Das entspricht einer Konzentration von  $60 \text{ pmol mg Zellprotein}^{-1}$ . Aus diesen Daten allein, lässt sich allerdings nicht auf die Anzahl der ProU-Transporter in *A. fulgidus* schließen, da die Stöchiometrie von Bindeprotein und Translokatorkomplex nicht zwingend 1:1 sein muss. Aus Gram-negativen Bakterien ist bekannt, dass die meisten ABC-Transporter einen Überschuss von Bindeproteinen rekrutieren (Ames *et al.*, 1996). Auch die Entdeckung chimärer Substratbinde/Translokator-Komplexe, in denen teilweise mehrere Substratbindeproteine mit einer Translokatorodomäne fusioniert sind, macht deutlich, dass die Stöchiometrie von

Bindeprotein und Translokator von einem 1:1-Verhältnis abweicht (van der Heide & Poolman, 2002).

## **2. Physiologische Rolle des ProU-Transporters**

### **2.1 Glycin Betain dient *A. fulgidus* nicht als Osmoprotektivum**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Substratbindeprotein ProX des ProU-Transporters *in vitro* als hochaffines Bindeprotein für Glycin Betain und Prolin Betain identifiziert. ProU dient *A. fulgidus* also als effektiver bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter für kompatible Solute. Glycin Betain fungiert in mesophilen Bacteria und methanogenen Archaea als universelles Osmoprotektivum (da Costa *et al.*, 1998). In *A. fulgidus* konnte aber widererwarten kein Zusammenhang zwischen der Präsenz von Glycin Betain im Medium und einer gesteigerten Toleranz gegenüber hyperosmotischen Bedingungen festgestellt werden (Abb. 14). Ein Fehlen des ProU-Transporters unter hochosmolaren Bedingungen als Ursache für die nicht vorhandene osmoprotektive Wirkung von Glycin Betain konnte in Westernblot-Analysen ausgeschlossen werden. ProX (und somit wahrscheinlich auch der gesamte ProU-Transporter) wird selbst in nicht-salzgestressten *A. fulgidus* Zellen exprimiert (Abb. 15). Im Kontrast zu der Situation in *E. coli* oder *B. subtilis*, wo die Menge von Aufnahmesystemen für kompatible Solute über die Osmolarität des Mediums reguliert wird (Csonka & Epstein, 1996; Kempf & Bremer, 1998a), führten hyperosmotische Wachstumsbedingungen allerdings zu keiner Induktion der Expression des ProU-Transporters in *A. fulgidus*. Es ist möglich, dass die basale Aufnahme von Glycin Betain durch ProU nicht ausreicht, um die Menge Glycin Betain zu akkumulieren, die für osmoprotektive Zwecke benötigt wird. In der Tat konnte in *A. fulgidus* und auch in anderen hyperthermophilen Archaea intrazellulär auch dann kein Glycin Betain detektiert werden, wenn die Organismen unter hyperosmotischen Bedingungen in Anwesenheit von Hefeextrakt (der Glycin Betain enthält) kultiviert wurden (da Costa *et al.*, 1998). Die Aufgabe von Glycin Betain als Osmoprotektivum kommt also in *A. fulgidus* nicht zum Tragen.

## 2.2 Glycin Betain dient nicht als C- oder N-Quelle

Neben seiner Funktion als Osmoprotektivum wird Glycin Betain von einigen Organismen anabol oder katabol verstoffwechselt. Unter aeroben Bedingungen kann Glycin Betain sukzessive zu Glycin demethyliert werden, wobei Dimethylglycin und Sarcosin (Methylglycin) als Intermediate auftreten (Smith *et al.*, 1988). Unter anaeroben Bedingungen wird Glycin Betain in verschiedenen fermentativen Stoffwechselprozessen abgebaut, die Trimethylamin als dominantes Endprodukt haben (Oren, 1990). Diese Verbindung kann wiederum von vielen methanogenen Archaea zu Kohlenstoffdioxid, Ammonium und Methan metabolisiert werden (Oren, 1990). In Sulfat-Reduzierern wurde die Nutzung von Glycin Betain als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle bisher nicht beschrieben und auch im Zuge der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass *A. fulgidus* zur Verstoffwechselung dieser Verbindung nicht in der Lage ist. Die mögliche Funktion von ProU als Transportsystem für eine C- oder N-Quelle kommt damit auch nicht in Betracht.

## 2.3 ProU vermittelt die Aufnahme von Glycin Betain zu thermoprotektiven Zwecken

Die Akkumulation kompatibler Solute wird gerade in vielen hyperthermophilen Mikroorganismen nicht allein von osmotischem Stress stimuliert, sondern findet auch statt, wenn die Organismen supraoptimalen Wachstumstemperaturen ausgesetzt sind (da Costa *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1997; Santos & Da Costa, 2002). Bisher wurde in dieser Organismengruppe als Antwort auf Hitzestress jedoch lediglich die Akkumulation kompatibler Soluten durch *de novo*-Synthese nachgewiesen (Santos & da Costa, 2002). Ob extern verfügbare kompatible Solute einen Effekt auf die Hitzetoleranz dieser Organismen haben, wurde bisher nicht untersucht. In mesophilen Bakterien und Pflanzen konnte nachgewiesen werden, dass das weitverbreitete kompatible Solut Glycin Betain neben seiner osmoprotektiven Wirkung das Wachstum dieser Organismen auch bei Hitzestress fördert (Alia *et al.*, 1998; Caldas *et al.*, 1999). Auch in *A. fulgidus* steigert extern verfügbares Glycin Betain oder Prolin Betain die Hitzetoleranz dieses Organismus. Während *A. fulgidus* bei 90°C in einem definierten Minimalmedium nicht in der Lage ist zu wachsen, ermöglicht die Präsenz von Glycin Betain und Prolin Betain ein Wachstum bei dieser Temperatur (Abb. 16). Schon seit längerer Zeit wird angenommen, dass *de novo* synthetisierte Solute die

Hitzetoleranz hyperthermophiler Organismen beeinflussen (Martins *et al.*, 1997; Santos & da Costa, 2002). Da aber bisher keine Mutanten existieren, die ihre Fähigkeit kompatible Solute zu synthetisieren verloren haben, konnte durch den wachstumsfördernden Effekt von extern verfügbarem Glycin Betain unter Hitzestress erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen kompatiblen Soluten und Hitzetoleranz in einem hyperthermophilen Organismus gezeigt werden.

*A. fulgidus* ist genetisch nicht zugänglich und es ist aus diesem Grund nicht möglich, ProU-Deletionsmutanten zu generieren. Daher lässt sich nicht zweifelsfrei beweisen, dass die Aufnahme von Glycin Betain unter Hitzestress durch ProU vermittelt wird. Es gibt jedoch zwei Argumente, die für diese These sprechen: Westernblot Analysen zeigten, dass die Menge von ProX im Zellextrakt von *A. fulgidus* hitzeabhängig reguliert wird. Bei 90°C liegt in *A. fulgidus* drei bis fünf mal mehr ProX vor als in ungestressten Zellen (Abb. 17) und daher ist eine Beteiligung von ProU an der hitzeinduzierten Glycin Betain-Aufnahme wahrscheinlich. Zudem führten BLAST-Analysen in der Genomsequenz von *A. fulgidus* zu dem Ergebnis, dass neben dem *proU*-Gencluster kein weiteres Gencluster in *A. fulgidus* existiert, dessen abgeleitete Polypeptide signifikante Sequenzidentitäten zu bereits charakterisierten primären oder sekundären Aufnahmesystemen für Glycin Betain und Strukturanaloga aufweisen. ProU dient damit vermutlich als alleiniges Aufnahmesystem für Trimethylammoniumverbindungen in *A. fulgidus*.

Um herauszufinden welche intrazelluläre Konzentration von Glycin Betain für die Thermoprotektion in *A. fulgidus* benötigt wird und die kinetischen Parameter des ProU-Transporters zu bestimmen, wäre es wünschenswert gewesen, die Aufnahme von Glycin Betain direkt in *A. fulgidus* zu messen. Aus anderen anaeroben hyperthermophilen Organismen ist bekannt, dass der Transport ausschließlich unter anaeroben Bedingungen und bei einer Temperatur in der Nähe des Wachstumsoptimums der jeweiligen Organismen nachgewiesen werden konnte (Proctor *et al.*, 1997; Xavier *et al.*, 1996). Alle Versuche im Rahmen dieser Arbeit einen derartigen Transportassay für *A. fulgidus* zu etablieren, schlugen jedoch fehl. Das Scheitern der Transportmessung beschränkte sich dabei nicht allein auf Glycin Betain, sondern auch der Transport anderer Aminosäuren, für die *A. fulgidus* Transporter besitzt, konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die verwendeten Versuchsbedingungen für den Nachweis des Transports von Verbindungen generell nicht geeignet waren. Welche Ursache es für das Scheitern dieser Transportassays gab, konnte nicht geklärt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Proteine aus hyperthermophilen Organismen auch in einem mesophilen Expressionswirt funktionell sein können und daher zur Komplementation eines vorhandenen Defekts dienen können (Piper *et al.*, 1996). Damit ist es möglich, die Eigenschaften dieser Proteine in einem heterologen Wirt zu charakterisieren. Die Komplementation des Glycin Betain-Aufnahme defekten *E. coli* Stammes MKH13 mit ProU aus *A. fulgidus* zeigte sich jedoch weder in einem Transportassay noch in einem Langzeitversuch erfolgreich. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Es ist möglich, dass nicht alle Untereinheiten des Transporters in *E. coli* funktionell und löslich exprimiert werden, da bisher lediglich die Aktivität des heterolog exprimierten Bindeproteins ProX nachgewiesen wurde. Zudem sind die Membranen von Archaea und Bacteria sehr unterschiedlich aufgebaut, was dazu führen könnte, dass die Membrankomponenten des ProU-Transporters aus *A. fulgidus* in *E. coli* nicht korrekt in die Membranen inseriert werden konnten. Eine weitere Erklärung für das Fehlen der Transportaktivität ist auf der einen Seite die Temperatur, die mit 37°C weit unter dem Wachstumsoptimum von *A. fulgidus* (83°C) lag, und die Tatsache, dass unter aeroben Bedingungen gearbeitet wurde. Die Bindung des Substrates durch das Bindeprotein ProX findet zwar unter aeroben Bedingungen statt, es konnte jedoch für andere anaerobe Organismen gezeigt werden, dass der Transport von Substraten durch ABC-Transporter sensitiv gegenüber Sauerstoff ist, obwohl die Funktionalität der entsprechenden Bindeproteine nicht durch Sauerstoff beeinflusst wurde (Horlacher *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 1996).

### **3. Die thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute *in vivo***

Bei hyperosmotischem Stress leisten die akkumulierten kompatiblen Solute in Mikroorganismen durch ihre osmotische Aktivität einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Turgors und bewahren Makromoleküle durch ihre präferentielle Exklusion von deren Hydrathülle vor der Dehydratisierung (Arakawa & Timasheff, 1985). Hitzestress hat jedoch einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Wasseraktivität, sondern stellt Mikroorganismen vor andere Probleme, die hauptsächlich mit der Sensitivität verschiedener Zellkomponenten gegenüber hohen Temperaturen in Zusammenhang stehen. Es stellt sich also die Frage, welche Wirkung kompatiblen Soluten *in vivo* bei der Förderung des Wachstums von Mikroorganismen bei hoher Temperatur zukommt.



### 3.1 Die stabilisierende Wirkung kompatibler Solute auf Proteine

Zu den Zellbestandteilen, die durch Temperaturen jenseits des Wachstumsoptimums in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, zählen unter anderem Proteine. In mesophilen Organismen besteht bei einem deutlichen Überschreiten der optimalen Wachstumstemperatur die Gefahr, dass Proteine denaturieren und damit ihre Funktionalität verlieren. In hyperthermophilen Mikroorganismen, die Wachstumsoptima zwischen 80 und 106°C aufweisen, besteht bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen zudem die Gefahr der irreversiblen Schädigung einiger Aminosäuren durch Deamidierung,  $\beta$ -Elimination, Oxidation oder Hydrolyse (Daniel *et al.*, 1996; Jaenicke, 1998) und außerdem setzt die mögliche Hydrolyse von Peptidbindungen ab einer gewissen Temperatur weitere theoretische Grenzen für die Proteinstabilität. Proteine hyperthermophilen Ursprungs sind daher auf verschiedene Weisen an die extreme Temperatur angepasst (s. Abschnitt 1.2) und weisen eine enorme intrinsische Stabilität auf. Zur extrinsischen Stabilisierung von Proteinen bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen kommt aber zusätzlich auch die protektive Wirkung kompatibler Solute in Betracht.

*In vitro*-Studien zum stabilisierenden Einfluss kompatibler Solute auf Proteine haben den positiven Einfluss dieser Verbindungen auf Hitzestabilität und die Verhinderung von Aggregation in einem weiten Temperaturbereich gezeigt (Borges *et al.*, 2002; Knapp *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1998). Zudem gibt es Erkenntnisse darüber, dass Proteine, die bei einer Überexpression die Tendenz zur Aggregation zeigen, in ihrer löslichen Form stabilisiert werden können, wenn der entsprechende Expressionswirt aufgrund von Salzstress kompatible Solute akkumuliert (Barth *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen verleiten zu der Annahme, dass der fördernde Einfluss kompatibler Solute auf das Wachstum von Zellen bei Hitzestress auch *in vivo* auf der Stabilisierung von Proteinen beruht. Tatsächlich konnte von Bourot *et al.* (2000) der Einfluss kompatibler Solute auf die Proteinfaltung *in vivo* bestätigt werden. Die Autoren generierten über chemische Mutagenese eine Lysin-auxotrophe *E. coli* Mutante, deren Auxotrophie auf einem Aminosäureaustausch in der Diaminopimelat-Decarboxylase (DAPDC) beruhte. In normalem Minimalmedium war diese Mutante nicht in der Lage zu wachsen. Eine Zugabe von 1 mM Glycin Betain und 0,5 M NaCl (um die Aufnahme von Glycin Betain zu stimulieren) zu dem Medium führte jedoch wieder zu einem Lysin-prototrophen Phänotyp. Um herauszufinden, worauf diese Wachstumsstimulation beruhte wurde die Wildtyp DAPDC und die mutierte DAPDC gereinigt und in Enzymassays auf ihre Aktivität untersucht. Die Aktivität der Wildtyp DAPDC wurde von Glycin Betain kaum

beeinflusst, während das kompatible Solut einen stark stimulierenden Effekt auf die Aktivität der mutierten DAPDC ausübte: in Abwesenheit von Glycin Betain war das mutierte Enzym nahezu inaktiv, doch durch die Zugabe von 1 M Glycin Betain konnte die Aktivität zumindest auf 1/10 der Wildtypaktivität gesteigert werden. Spektroskopische Analysen zeigten, dass der Verlust der Aktivität der mutierten DAPDC aus strukturellen Veränderungen des Enzyms resultierte und die Zugabe von Glycin Betain die korrekte Faltung des mutierten Enzyms förderte. Es ist daher davon auszugehen, dass Glycin Betain auch *in vivo* die korrekte Faltung der mutierten DAPDC stimuliert und somit die Wiederherstellung des lysinprototrophen Phänotyps gewährleistet (Bourot *et al.*, 2000).

Diamant *et al.* (2001) haben eine andere These für die Wirkungsweise kompatibler Solute bei Hitzestress *in vivo*. Sie postulieren ein Zusammenwirken dieser Verbindungen mit Chaperonen. Diese Proteine werden unter Hitzestress massiv synthetisiert und interagieren mit denaturierten Proteinen, verhindern deren Aggregation und tragen zur Rückfaltung der Proteine bei oder sorgen für deren Abbau (Hendrick & Hartl, 1993). Diamant und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch osmotischen Stress akkumuliertes Glycin Betain die durch Hitzestress verursachte *de novo* Proteinaggregation *in vivo* deutlich verringert. *In vitro*-Studien an Malat-Dehydrogenase zeigten zudem einen positiven Effekt der kompatiblen Solute Glycin Betain, Prolin, Trehalose und Glycerin auf die Faltungsaktivität der Chaperone GroEL, DnaK und ClpB. Die Rückfaltungsrate denaturierter Malat-Dehydrogenase in Anwesenheit kompatibler Solute war deutlich höher als ohne diese Verbindungen (Diamant *et al.*, 2001). Die Autoren ziehen verschiedene Mechanismen für die aktivierende Wirkung der kompatiblen Solute auf Chaperone in Betracht. Zum einen könnten kompatible Solute die lokale Rückfaltung chaperongebundener Proteine fördern oder das korrekt gefaltete Endprodukt der Faltungsreaktion stabilisieren und auf diese Weise die Produktivität der Chaperone steigern. Zudem wäre es auch möglich, dass kompatible Solute das Chaperon selbst stabilisieren oder auf eine bisher nicht geklärte Weise direkt aktivieren (Diamant *et al.*, 2001). Die fördernde Eigenschaft kompatibler Solute auf das Wachstum von Mikroorganismen bei Hitzestress könnte also auch auf die Interaktion dieser Verbindung mit molekularen Chaperonen und der damit verbundenen aktiveren Rückfaltung aggregierter Proteine zurückgeführt werden.

Eine weitere Beobachtung, die für die Bedeutung kompatibler Solute bei der Stabilisierung von Proteinen unter Hitzestress spricht, ist, dass einige Proteine, die aus thermophilen Organismen gereinigt wurden, *in vitro* eine unerwartet geringe Resistenz gegenüber Hitzeinaktivierung aufweisen (Fabry & Hensel, 1987; Thomm *et al.*, 1986). Das spricht für

die Notwendigkeit stabilisierender Mechanismen zur extrinsischen Stabilisierung der Proteine *in vivo*. Da viele thermophile Organismen als Antwort auf hohe Wachstumstemperaturen kompatible Solute anhäufen, die auch *in vitro* thermoprotektiv wirken, ist es naheliegend, dass diese Verbindungen auch für die Stabilisierung der Proteine *in vivo* verantwortlich sind (Sternier & Liebl, 2001). Diese Hypothese lässt sich allerdings nicht generalisieren, da es einige (hyper)thermophile Organismen gibt, die auch bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen keine signifikanten Mengen kompatibler Solute anhäufen und daher offenbar nicht auf diese Art der extrinsischen Proteinstabilisierung angewiesen sind (Lamosa *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1996).

### **3.2 Die mögliche thermoprotektive Wirkung kompatibler Solute auf Membranen**

Eine weitere Zellkomponente, die durch das Wachstum bei supraoptimalen Temperaturen in Mitleidenschaft gezogen wird, ist die Cytoplasmamembran. In *B. subtilis* und einer Reihe weiterer Bakterien nimmt die Fluidität der Membran linear abhängig von der Temperatur zu (van de Vossenberg *et al.*, 1999). Um dem entgegenzuwirken, wird der Anteil ungesättigter Fettsäuren bei hohen Temperaturen reduziert und es werden bevorzugt Fettsäuren mit längeren Acyl-Ketten eingebaut (van de Vossenberg *et al.*, 1999). Diese Art der Anpassung hat jedoch Grenzen und wenn die Temperatur über ein gewisses Limit steigt, ist die Bilayer-Struktur der Membran gefährdet (Dowhan, 1997). Das führt zu Membrandefekten und hat einen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Membran.

Bisher liegen keine Daten zu hitzestabilisierenden Effekten kompatibler Solute auf Membranen vor. Es gibt aber Untersuchungen die zeigen, dass z.B. das kompatible Solut Trehalose Membranen vor Schäden durch Austrocknung bewahrt (Crowe *et al.*, 1987). Ist keine Trehalose vorhanden, führt Austrocknung dazu, dass Wasser, das über Wasserstoffbrücken mit den polaren Kopfgruppen der Lipide interagiert, verloren geht. Das hat die Konsequenz, dass der Abstand der Lipide abnimmt und die van der Waals-Interaktionen der Lipidseitenketten zunehmen. Damit liegt die Membran bei Austrocknung selbst bei physiologisch relevanten Temperaturen im gel-förmigen Zustand vor, was nicht mit einwandfreier Funktion vereinbar ist. Trehalose bildet Wasserstoffbrücken mit den polaren Kopfgruppen der Lipide aus und gewährleistet so auch unter dehydrierenden Bedingungen eine Erhaltung des normalen flüssig-kristallinen Zustands der Membranen (Crowe *et al.*,

1985). Im Gegensatz zu der stabilisierenden Wirkung kompatibler Solute auf Proteine, die am ehesten durch die präferentielle Exklusion dieser Verbindung aus der Hydrathülle von Proteinen und der damit verbundenen Hydratisierung der Makromoleküle erklärt werden kann (Arakawa & Timasheff, 1985), ist die Wechselwirkung der Trehalose mit den Membranen spezifisch. Es ist daher davon auszugehen, dass verschiedene kompatible Solute unterschiedlich auf die Membranintegrität wirken. Da aber prinzipiell eine protektive Wirkung dieser Verbindungen auf diesen Zellbestandteil gezeigt werden konnte, ist auch eine Beteiligung kompatibler Solute bei der Hitzeprotektion von Membranen denkbar.

#### **4 Transport und Nutzung kompatibler Solute bei Hitzestress in *Bacillus subtilis***

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass Glycin Betain und Prolin Betain von dem hyperthermophilen Archaeon *A. fulgidus* zu thermoprotektiven Zwecken genutzt werden. Daten zur thermoprotektiven Wirkung dieser Verbindungen in mesophilen Organismen stammen bisher hauptsächlich aus Untersuchungen in Pflanzen. Genetisch manipulierte *Arabidopsis thaliana*, welche die Cholin-Oxidase CodA aus *Arthrobacter globiformis* exprimieren und daher in der Lage sind, Glycin Betain aus dem Vorläufer Cholin zu synthetisieren, wurden eingehend auf ihre Hitzetoleranz untersucht (Alia *et al.*, 1998). Bei 22°C zeigte sich zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen kein Unterschied in der Keimeffizienz, während bei 32,5°C nur die transgene Pflanze in der Lage war zu keimen. Auch die Wachstumsgeschwindigkeiten von Wildtyp und transgener Pflanze waren bei erhöhter Temperatur unterschiedlich. Bei 35°C wuchs die Pflanze, die Glycin Betain synthetisieren konnte, doppelt so schnell wie der Wildtyp (Alia *et al.*, 1998). Glycin Betain wirkt also auch in Pflanzen thermoprotektiv. Analysen, die im Hinblick auf die hitzeprotektive Wirkung kompatibler Solute in mesophilen Bakterien durchgeführt wurden, zeigen eine ähnliche Tendenz. So fördert beispielsweise das Vorhandensein von Ectoin oder Hydroxyectoin im Medium das Wachstum von *Streptomyces*-Stämmen und *E. coli* bei supraoptimalen Temperaturen (Malin & Lapidot, 1996). Welche weiteren kompatiblen Solute von mesophilen Organismen als Thermoprotektiva genutzt werden und welche Aufnahmesysteme dem Transport dieser Verbindungen bei Hitzestress dienen ist weitgehend ungeklärt.

Im Zuge von Untersuchungen zur Osmoadaptation von *B. subtilis* konnten fünf Transportsysteme für die Aufnahme kompatibler Solute identifiziert werden (Kempf & Bremer, 1998a) und zudem ist die *de novo*-Synthese des kompatiblen Soluts Prolin in diesem Organismus gut untersucht (Brill & Bremer, 2002). *B. subtilis* stellte damit einen idealen Kandidaten zur Analyse der Aufnahme und Nutzung kompatibler Solute unter Hitzestress dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass die Verfügbarkeit von Glycin Betain das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C deutlich förderte (Abb. 19). Die maximale Wachstumstemperatur wurde durch Glycin Betain im Medium im Gegensatz zu der Situation bei *A. fulgidus* allerdings nicht erhöht.

Nach dem „preferential exclusion“-Modell (Arakawa & Timasheff, 1985) beruht die stabilisierende Wirkung kompatibler Solute auf Makromoleküle nicht auf einer spezifischen Wechselwirkung, sondern auf einem Ausschluss dieser Verbindung aus der Hydrathülle von Makromolekülen. Demnach sollten alle kompatiblen Solute auch *in vivo* thermoprotektiv wirken, solange sie effizient und in ausreichender Konzentration aufgenommen werden können. Die Analyse der Wirkung zehn weiterer kompatibler Solute, die von *B. subtilis* auch als Osmoprotektiva genutzt werden, zeigte, dass neben Glycin Betain auch Strukturanaloga dieser Verbindung und Methylsulfoniumverbindungen einen fördernden Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 52°C ausübten, während Cholin-O-sulfat, Prolin Betain und Ectoin nicht thermoprotektiv wirkten (Abb. 21). Die Ursache für die fehlende thermoprotektive Wirkung von Ectoin lässt sich auf die vergleichsweise geringe Affinität des OpuC-Transporters zurückführen, der zur Aufnahme dieser Verbindung in *B. subtilis* dient (Jebbar *et al.*, 1997). Warum Cholin-O-sulfat und Prolin Betain nicht thermoprotektiv wirkten, konnte dagegen nicht geklärt werden, da *B. subtilis* ein hochaffines Aufnahmesystem für diese Substanzen zur Verfügung steht und der ungenügende Transport damit als Ursache ausschied (Nau-Wagner *et al.*, 1999). Gerade für Prolin Betain ist dieses Resultat unerklärlich, da es in *A. fulgidus* thermoprotektiv wirkte. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Cholin-O-sulfat in *B. subtilis* auch keine kryoprotektive Wirkung aufweist (T. Hoffmann, Universität Marburg, pers. Mitteilung). Auch für diesen Befund gibt es bis heute keine Erklärung.

Im Zuge dieser Arbeit konnte durch Mutanten-Analyse zweifelsfrei demonstriert werden, dass *B. subtilis* bei 52°C zur Aufnahme kompatibler Solute dieselben Transporter nutzt wie unter hyperosmotischem Stress. Neben den Opu-Transportern wurde auch unter Hitzestress keine weitere Glycin Betain-Aufnahmeaktivität detektiert. Somit konnte erstmals für ein Bakterium

gezeigt werden, dass die Transporter, die im Zusammenhang mit der Akkumulation kompatibler Solute unter osmotischem Stress identifiziert wurden, auch für den Transport dieser Verbindungen bei supraoptimalen Wachstumstemperaturen verantwortlich sind. Den Opu-Transportern kommt also in *B. subtilis* eine Bedeutung bei der Anpassung an drei verschiedene Stressarten zu, da diese Transporter zusätzlich zu ihrer Funktion bei der Osmoadaptation und ihrem Beitrag zur Anpassung an Hitzestress auch für den Transport kompatibler Solute zu kryoprotektiven Zwecken rekrutiert werden (T. Hoffmann, Universität Marburg, pers. Mitteilung).

Ähnlich wie unter hyperosmotischen Bedingungen wurde die Transkription aller Strukturgene der Opu-Transporter bei 52°C induziert (Abb. 23). Neben der Induktion auf transkriptioneller Ebene, wird die Aktivität der Opu-Transporter (mit Ausnahme von OpuE) unter Salzstress auch auf Proteinebene aktiviert (Kempf & Bremer, 1998b; von Blohn *et al.*, 1997). Untersuchungen zur Aufnahme von Glycin Betain unter Hitzestress ergaben jedoch, dass die Transportrate, trotz transkriptioneller Induktion der *opu*-Gene, bei 52°C im Vergleich zu 37°C deutlich verlangsamt war (Abb. 24). Über die Ursache dafür lässt sich nur spekulieren. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Transportrate der Opu-Transporter bei 52°C ist, dass die Untereinheiten der Transporter bei dieser Temperatur aufgrund thermischer Inaktivierung nur eingeschränkt funktionsfähig sind.

Trotz der reduzierten Transportrate ergab eine Bestimmung des intrazellulären Glycin Betain-Pools eine identische Konzentration dieses Soluts sowohl bei 52°C als auch bei 37°C (Abb. 25). Dieser Befund steht im Einklang zu Untersuchungen in *E. coli*, die zeigten, dass der Glycin Betain- und Cholin-Pool von *E. coli* Zellen bei normalen Wachstumsbedingungen und unter Hitzestress ebenfalls gleich war (Caldas *et al.*, 1999). Somit müssen kompatible Solute unter Hitzestress offenbar nicht, wie bei osmotischem Stress, bis zu molaren Konzentrationen angehäuft werden, um ihre thermoprotektive Wirkung zu entfalten. Das macht wiederum deutlich, dass die Hauptaufgabe kompatibler Solute bei supraoptimalen Wachstumsbedingungen eine andere ist als bei osmotischem Stress. Zur Stabilisierung von Makromolekülen bei Hitzestress werden offenbar deutlich geringere Mengen kompatibler Solute benötigt als zum Schutz der Zellen vor Dehydratisierung. *In vitro*-Studien mit Citrat-Synthase haben gezeigt, dass 50 mM Glycin Betain genügen, um das Enzym gegen thermische Inaktivierung zu schützen (Caldas *et al.*, 1999). Die von *B. subtilis* bei 52°C akkumulierte Glycin Betain-Konzentration (100 mM) wäre also ausreichend. Andere Untersuchungen belegen jedoch eine effizientere Protektion von Proteinen vor hitzebedingten Schäden durch höhere Konzentrationen verschiedener kompatibler Solute

(Borges *et al.*, 2002; Knapp *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1998; Singer & Lindquist, 1998). Die Tatsache, dass Glycin Betain von *B. subtilis* bei 52°C lediglich zu einer Konzentration von etwa 100 mM akkumuliert wird, erklärt möglicherweise auch den im Vergleich zu der Situation in *A. fulgidus* recht geringen thermoprotektiven Effekt von Glycin Betain. In *A. fulgidus* bewirkte Glycin Betain eine Steigerung der maximalen Wachstumstemperatur, während die Verbindung in *B. subtilis* das Wachstum des Organismus bei 52°C lediglich förderte. Eine vermehrte Akkumulation kompatibler Solute, wie sie unter hyperosmotischen Bedingungen auftritt, könnte daher auch in *B. subtilis* zu einer gesteigerten Hitzetoleranz führen.

## 5 Der Einfluss *de novo* synthetisierter Solute auf die Hitzetoleranz

In hyperthermophilen Archaea existiert eine positive Korrelation zwischen der Wachstumstemperatur und der Menge *de novo* synthetisierter kompatibler Solute (Santos & da Costa, 2002). Parallelen zu dieser Art der Hitzestressantwort gibt es auch in Hefen, die als Anpassung an supraoptimale Wachstumstemperaturen das kompatible Solut Trehalose *de novo* synthetisieren (Argüelles, 1997; De Virgilio *et al.*, 1994; Hottinger *et al.*, 1987). So steigt der Trehalosegehalt in *Candida albicans*-Zellen bei einer Erhöhung der Wachstumstemperatur von 28°C auf 42°C innerhalb einer Stunde um das 10-fache. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *Saccharomyces cerevisiae* gemacht und die phänotypische Charakterisierung einer Mutante mit einem Defekt in der Trehalose-Synthase zeigte, dass diese Mutante deutlich hitzesensitiv ist (De Virgilio *et al.*, 1994). Somit war der Beitrag von Trehalose zur Thermoadaptation in *S. cerevisiae* bewiesen. Auch in Bakterien konnte ein Zusammenhang zwischen durch *de novo*-Synthese akkumulierten kompatiblen Soluten und Hitzetoleranz festgestellt werden. So sind *E. coli*-Zellen in der stationären Phase deutlich toleranter gegenüber Hitzestress als exponentiell wachsende Zellen, da sie stationärphaseabhängig Trehalose akkumulieren (Hengge-Aronis *et al.*, 1991).

Schon vor über 25 Jahren führten Untersuchungen, die hauptsächlich in Zusammenhang mit der Konservierung von Lebensmitteln standen, zu dem Ergebnis, dass die Erhöhung der Osmolarität eines Mediums die maximale Wachstumstemperatur von Bakterien erhöhen kann (Calhoun & Frazier, 1966; Goepfert *et al.*, 1970; Tesone *et al.*, 1981). Die Ursache für dieses Phänomen blieb lange Zeit ungeklärt. In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass offenbar die Akkumulation kompatibler Solute bei hyperosmotischen Stress für die

gesteigerte Hitzetoleranz von Bakterien unter diesen Bedingungen verantwortlich ist (Canovas *et al.*, 2001; Fletcher & Csonka, 1998). *Salmonella enterica* akkumuliert osmotisch stimuliert Trehalose, die ausgehend von Glucose-6-phosphat und UDP-Glucose abhängig von der Trehalose-6-phosphat-Synthetase (OtsA) und der Trehalose-6-Phosphatase (OtsB) synthetisiert wird. Die Enzyme zur Umsetzung der beiden Substrate sind im *otsBA*-Operon codiert, das unter der Kontrolle des alternativen Sigmafaktors RpoS steht. *Salmonella enterica*-Mutanten mit einem Defekt in OtsA sind nicht mehr in der Lage, unter hyperosmolaren Bedingungen Trehalose zu akkumulieren und zudem wird das Wachstum dieser Mutanten bei 45°C durch moderaten osmotischen Stress nicht mehr gefördert (Canovas *et al.*, 2001). Die Akkumulation dieses kompatiblen Soluts ist also Voraussetzung für die osmotisch stimulierte Hitzetoleranz. Unabhängig von hyperosmotischem Stress werden die Gene für die Trehalosesynthese in *S. enterica* auch durch Hitzestress allein induziert (Canovas *et al.*, 2001).

Die weite Verbreitung der hitzeprotektiven Wirkung *de novo* synthetisierter kompatibler Solute in hyperthermophilen Archaea, Eukarya und Bacteria spricht für eine integrale Bedeutung der *de novo*-Synthese kompatibler Solute bei der Anpassung an supraoptimale Wachstumsbedingungen.

*B. subtilis* akkumuliert unter osmotischem Stress Prolin, wobei die Synthese abhängig von den Enzymen ProH, ProJ und ProA verläuft (Brill & Bremer, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription des *proHJ*-Operons, genau wie die des *otsBA*-Operons in *S. enterica*, durch Hitzestress (52°C) deutlich induziert wird, während das Transkriptionsniveau von *proA* nicht beeinflusst wird (Abb. 27). Dieses Induktionsmuster ist auch unter osmotischem Stress verwirklicht, wobei die Induktion der Gene zur massiven Akkumulation von Prolin führt (Brill & Bremer, 2002). Die Transkription des *proHJ*-Operons steht sowohl unter Hitzestress als auch bei erhöhter Osmolarität unter der Kontrolle eines Promotors der von dem vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  erkannt wird (Abb. 28).

Wie oben erwähnt führt in *S. enterica* eine Mutation, die einen Verlust der osmotisch stimulierten Trehalosesynthese bewirkt, zu einem hitzesensitiven Phänotyp der Mutante. Im Kontrast dazu zeigte die Analyse einer *B. subtilis* ProHJ-Mutante unter Hitzestress im Rahmen dieser Arbeit, dass die Mutation widererwarten keinen Einfluss auf das Wachstum dieses Stammes bei 52°C ausübte. Das spricht dafür, dass die Akkumulation von Prolin durch *de novo*-Synthese in *B. subtilis* offenbar nicht essentiell für die Anpassung dieses Organismus an supraoptimale Wachstumsbedingungen ist. Im Einklang damit ließ sich in hitzestressen



*B. subtilis* Zellen auch kein Prolin detektieren. Auch der Befund, dass erhöhte Osmolarität *B. subtilis* keine gesteigerte Toleranz gegenüber hohen Temperaturen vermittelt korreliert mit diesem Ergebnis. Die in hyperthermophilen Archaea, Hefen und einigen Bakterien verwirklichte *de novo*-Synthese kompatibler Solute zum Schutz vor dem negativen Einfluss hoher Temperaturen (Argüelles, 1997; Canovas *et al.*, 2001; De Virgilio *et al.*, 1994; Hottinger *et al.*, 1987) spielt also in *B. subtilis* keine Rolle.

Da die *proHJ*-Gene bei 52°C induziert werden, stellt sich die Frage nach der Ursache für das Fehlen der Prolinakkumulation bei dieser Temperatur. Wie im Rahmen dieser Arbeit schon für den Glycin Betain-Transport durch die Opu-Transporter gezeigt werden konnte, ist es möglich, dass die Aktivität der Enzyme bei dieser Temperatur aufgrund thermischer Inaktivierung eingeschränkt ist. Es ist unwahrscheinlich, dass die Prolinsynthese völlig zum Erliegen kommt, da die Aminosäure auch für anabole Zwecke benötigt wird und *B. subtilis* bei 52°C nicht prolinauxotroph ist. Die Tatsache, dass in den Messungen kein Prolin detektiert werden konnte lässt sich möglicherweise auch auf technische Schwierigkeiten zurückführen, da *B. subtilis*-Zellen, die bei 52°C kultiviert wurden, teilweise sehr leicht lysierten.

## 6 Hitzeabhängige Regulation von Genen

Die Expression der Gene der Opu-Transporter und des *proHJ*-Operons wird bei Hitzestress induziert und diese Gene stehen zudem auch unter osmotischer Kontrolle (Brill & Bremer, 2002; Kempf & Bremer, 1998b). Die molekularen Grundlagen zur Induktion von Genen unter osmotischem Stress sind bisher nicht bekannt, während die Mechanismen, die zur temperaturabhängigen Regulation von Genen beitragen, gut untersucht sind.

Eine Möglichkeit der positiven Kontrolle stellt die Regulation von Genen über einen alternativen Sigmafaktor dar. Im Zusammenhang mit der Anpassung von *B. subtilis* an widrige Umweltbedingungen ist das  $\sigma^B$ -Regulon am besten charakterisiert (Hecker *et al.*, 1996). Analysen des Transkriptoms und andere Ansätze zur Identifizierung  $\sigma^B$ -abhängiger Gene zeigten, dass es mit mehr als 120 Genen eines der größten Regulons in *B. subtilis* darstellt (Petersohn *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2001).  $\sigma^B$  wird durch eine Reihe von Stressfaktoren (Nährstofflimitation, Hitze, Kälte, Ethanol oder hohe Osmolarität) transient induziert und sorgt für die Expression zahlreicher Stressproteine, welche der Zelle eine

multiple Stressresistenz vermitteln (Volker *et al.*, 1999). Vorläufige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine besondere Bedeutung des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  unter Hitzestress, weil  $\sigma^B$ -abhängige Gene bei Langzeit-Wachstum unter supraoptimalen Temperaturen eine vom normalen Induktionsmuster abweichende Induktion aufwiesen (Abb. 34). Während  $\sigma^B$  als Antwort auf Stress normalerweise nur transient induziert wird, bleibt die  $\sigma^B$ -abhängige Expression von Genen bei Langzeit-Hitzestress über lange Zeit auf einem erhöhten Level (Abb. 34). Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon unter Langzeit-Kältestress in *L. monocytogenes* gemacht. Hier wird die Transkription  $\sigma^B$ -abhängiger Gene im Vergleich zu anderen Stressarten deutlich verzögert induziert und die Transkription bleibt ebenfalls über lange Zeit auf einem erhöhten Level (Becker *et al.*, 2000). Das impliziert, dass dem  $\sigma^B$ -Regulon bei der Anpassung an Temperaturen außerhalb des Wachstumsoptimums offenbar eine weit größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen. Weitere Untersuchungen zur Beteiligung von  $\sigma^B$  bei der Langzeitadaptation an supraoptimale Temperaturen stehen allerdings noch aus.

Der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$  kann allerdings nur für einen Teil der unter Hitzestress induzierten Gene eine Rolle spielen, da die in dieser Arbeit untersuchten Gene mit Ausnahme von *opuE* und *opuD* von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor aus transkribiert werden (Kempf & Bremer, 1998a; Spiegelhalter & Bremer, 1998; von Blohn *et al.*, 1997).

Für die hitzebedingte Regulation  $\sigma^A$ -abhängige Gene kommt eine Regulation über einen Repressor in Betracht. In Zusammenhang mit Untersuchungen Hitzeschock-induzierbarer Gene, die in *B. subtilis* abhängig von dem vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  transkribiert werden, stellte sich heraus, dass viele dieser Gene regulatorische DNA-Sequenzen aufweisen, die als Repressor-Bindestelle identifiziert wurden (Narberhaus, 1999). Diese Gene werden unter normalen Wachstumsbedingungen reprimiert und durch Hitzestress induziert. Das am besten charakterisierte und am weitesten verbreitete Repressor-System besteht aus dem Repressor HrcA und dem DNA-Element CIRCE. Die Bindung von HrcA an CIRCE hindert die RNA-Polymerase unter normalen Wachstumsbedingungen daran, an den entsprechenden Promotor zu binden und das Gen zu transkribieren (Yuan & Wong, 1995). Für das Freisetzen des Repressors vom DNA-Element bei einem Hitzeschock gibt es bisher nur Modelle, die darauf beruhen, dass das Chaperon GroEL ein spezifischer Modulator des CIRCE-Regulons ist (Mogk *et al.*, 1997). Dieses Modell setzt voraus, dass GroEL HrcA unter normalen Wachstumsbedingungen in seine aktive Konformation bringt, so dass HrcA an die DNA binden kann. Unter Hitzeschockbedingungen ist GroEL in die Rückfaltung von Proteinen

eingebunden und HrcA nimmt eine inaktive Konformation an, was mit einem Verlust seiner Bindung an DNA einhergeht. Da das *groEL*-Operon selbst unter der Kontrolle von HrcA steht ist der Prozess selbstlimitierend, sobald die Zellen sich wieder erholt haben (Narberhaus, 1999). Für die *opu*-Gene und das *proHJ*-Operon scheidet die Regulation über HrcA und das CIRCE-Element allerdings aus, da eine Inspektion der Genomsequenz von *B. subtilis* ergeben hat, dass lediglich die *groE*- und *dnaK*-Transkriptionseinheiten ein CIRCE-Element aufweisen. Auch andere bisher identifizierte Repressoren, die in die Regulation hitzeabhängig exprimierter Gene eingebunden sind (Narberhaus, 1999), kommen nicht in Frage, da auch keine konservierten Konsensussequenzen der entsprechenden Bindestellen vor dem *proHJ*-Operon und den *opu*-Genen zu finden sind.

Eine weitere Möglichkeit der temperaturabhängigen Regulation bietet ein Zwei-Komponenten System. Da es unwahrscheinlich ist, dass die Temperatur direkt von einer Sensorkinase wahrgenommen werden kann, stellt sich die Frage nach dem Stimulus, der für die Zelle das Signal „hohe Temperatur“ vermittelt und zur Prozessierung des Signals führt. Supraoptimale Wachstumstemperaturen führen zu Änderungen der Lipidzusammensetzung der Membran. Bei erhöhter Temperatur sinkt die Anzahl ungesättigter Fettsäuren, während die durchschnittliche Länge der Acyl-Ketten zunimmt (Dowhan, 1997; van de Vossenberg *et al.*, 1999). Derartige Änderungen in der Membran könnten über eine Sensorkinase wahrgenommen werden und über Phosphorylierung an einen Responsregulator weitergegeben werden, der letztendlich zur Induktion hitzeregulierter Gene beiträgt. Ein auf diese Weise arbeitendes Zwei-Komponentensystem wurde von Aguilar und Mitarbeitern im Zusammenhang mit der Kältestressantwort von *B. subtilis* identifiziert (Aguilar *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2001). Um die Fluidität von Membranen auch bei niedrigen Wachstumstemperaturen zu gewährleisten rekrutiert *B. subtilis* eine  $\Delta^5$ -Lipid-Desaturase, die den Sättigungsgrad von Fettsäuren durch Einführung einer Doppelbindung erniedrigt (Aguilar *et al.*, 1998). Die Expression des Gens (*des*) dieses Enzyms ist strikt temperaturabhängig und ist bei 37°C reprimiert, während sie durch Kälte induzierbar ist. Die Kontrolle der Expression wird dabei von dem Zwei-Komponentensystem DesK-DesR vermittelt. Die Sensorkinase DesK ist in der Membran lokalisiert und der Übergang der Membranen vom flüssig-kristallinen in den gel-förmigen Zustand unter Kältestress aktiviert die Autokinaseaktivität dieses Polypeptids. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf den Responsregulator DesR übertragen, der in phosphorylierter Form die Expression des *des*-Gens aktiviert (Aguilar *et al.*, 2001).

Untersuchungen des Transkriptionsprofils von *B. subtilis* führten zu dem Ergebnis, dass dieses Zwei-Komponentensystem ausschließlich der Regulation der Transkription von *des* dient (Beckering *et al.*, 2002). Es wäre also denkbar, dass auch zur Perzeption und Weiterleitung der Veränderung der Membran durch Hitzestress, ein derartiges bisher nicht identifiziertes System zum Einsatz kommt.

## **7. Die Rolle von Glutamat bei der Anpassung an supraoptimale Temperaturen**

Die Akkumulation von Glutamat wurde in Zusammenhang mit der Osmostressantwort in verschiedenen Bakterien nachgewiesen (Csonka, 1989; da Costa *et al.*, 1998). Dabei kommt der Anhäufung dieses Substrates in verschiedenen Phasen der Anpassung an hyperosmotische Wachstumsbedingungen eine Bedeutung zu. Als initiale Antwort auf erhöhte Osmolarität wird von Bakterien Kalium angehäuft (Epstein, 1986; Galinski, 1995; Kempf & Bremer, 1998b) und in einigen Gram-negativen Bakterien (z.B. in *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*) wird als Gegenion dazu Glutamat synthetisiert, um die Elektroneutralität in der Zelle zu gewährleisten (Csonka & Epstein, 1996; Velasco *et al.*, 1995). Neben dieser nur transienten Akkumulation dieser Aminosäure, kommt Glutamat in einigen Bakterien auch bei der Langzeitadaptation an hyperosmotische Wachstumsbedingungen eine Bedeutung zu. So wird Glutamat in verschiedenen *Bacilli* als einziges Solut bei osmotischem Stress *de novo* synthetisiert (Kuhlmann & Bremer, 2002) und es konnte gezeigt werden, dass es in *E. coli* fördernd auf das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen wirkt, wenn es exogen zur Verfügung steht (Gauthier *et al.*, 1993). So kommt ihm trotz seiner negativen Ladung und der Tatsache, dass es metabolisch nicht inert ist, in einigen Organismen die Rolle als kompatibles Solut zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glutamat in *B. subtilis* wie die anderen getesteten compatible Solute auch thermoprotektiv wirkt (Abb. 30). Dabei ist die Transportrate bei 52°C im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen um die Hälfte reduziert, die Zellen akkumulieren die Aminosäure aber in derselben Konzentration, wie unter normalen Wachstumsbedingungen (Abb. 31&32).

In *B. subtilis* JH642 wurde bisher ein Glutamat-Transporter (GltT) charakterisiert (Kerres, 2002), es ist jedoch nicht klar, ob dem Organismus noch weitere Aufnahmesysteme für diese Aminosäure zur Verfügung stehen. Ob GltT auch für die Aufnahme von Glutamat bei 52°C

verantwortlich ist, oder ob unter diesen Bedingungen ein weiterer Glutamat-Transporter involviert ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher beleuchtet.

Glutamat wird bei osmotischem Stress nur von wenigen Mikroorganismen als kompatibles Solut genutzt und die protektive Wirkung dieser Verbindung vermittelt nur mäßige Toleranz gegenüber hyperosmotischen Wachstumsbedingungen. Zudem liegen bisher keine *in vitro*-Studien zur stabilisierenden Wirkung von Glutamat auf Proteine vor. Es stellt sich daher die Frage, ob Glutamat wie die anderen getesteten Solute bei 52°C zur Protektion von Makromolekülen beiträgt, oder ob der Aminosäure bei der Anpassung an Hitzestress eine andere Rolle zukommt.

Es ist denkbar, dass Glutamat *per se* keine Hitzeprotektion vermittelt, sondern erst zu Prolin umgesetzt werden muss, um thermoprotektiv zu wirken. Wie aber im Rahmen dieser Arbeit schon gezeigt werden konnte, wird unter Hitzestress kein Prolin *de novo* synthetisiert und auch eine ProHJ-Mutante, die einen Defekt in dem von Glutamat ausgehenden Prolinsyntheseweg aufweist, wird durch Glutamat protektiert. Die Hitzeprotektive Wirkung von Glutamat ist damit unabhängig von der Umsetzung zu Prolin und es ist wahrscheinlich, dass ihm eine andere Rolle als den klassischen kompatiblen Soluten zukommt.

In *E. coli* konnte schon vor längerer Zeit gezeigt werden, dass einer der ersten Prozesse, die bei Wachstumstemperaturen über 42°C inhibiert werden, die Methionin-Biosynthese ist (Ron & Davis, 1971). Eine Supplementation des Mediums mit Methionin steigert die maximale Wachstumstemperatur von *E. coli* auf 43-44°C. Es ist vorstellbar, dass in *B. subtilis* die abrupte Einstellung des Wachstums oberhalb von 52°C ebenfalls auf der thermischen Inaktivierung eines essentiellen Biosynthesewegs beruht. Führt man sich vor Augen, dass Glutamat eine zentrale Rolle im bakteriellen Metabolismus zukommt (Umbarger, 1978), ist es naheliegend, dass das Vorhandensein dieser Aminosäure einen möglichen hitzeabhängigen Defekt eines entsprechenden Syntheseweges ausgleichen könnte. Damit würde die thermoprotektive Wirkung von Glutamat nicht auf seine möglichen stabilisierenden Eigenschaften als kompatibles Solut zurückgehen, sondern allein auf der Komplementation eines metabolischen Defekts bei supraoptimalen Temperaturen beruhen.

## VI LITERATUR

**Achenbach-Richter, L., Stetter, K. O. & Woese, C. R. (1987).** A possible biochemical missing link among the archaeobacteria. *Nature* **327**, 348-249.

**Aguilar, P. S., Cronan, J. E. & de Mendoza, D. J. (1998).** A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**, 2194-2200.

**Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, S. E., Erazo, A. C. & de Mendoza, D. J. (2001).** Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **20**, 1681-1691.

**Albers, S. V., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (1999).** A unique short signal sequence in membrane-anchored proteins of Archaea. *Mol Microbiol* **31**, 1595-1596.

**Albers, S. V., van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. & Konings, W. N. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles* **5**, 285-294.

**Alia, Hayashi, H., Sakamoto, A. & Murata, N. (1998).** Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycine betaine. *Plant J* **16**, 155-161.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

**Ambulos, N. P., Jr., Duvall, E. J. & Lovett, P. S. (1987).** The mRNA for an inducible chloramphenicol acetyltransferase gene is cleaved into discrete fragments in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**, 967-972.

**Ames, G. F. L. (1986).** Bacterial periplasmic transport systems. *Annu Rev Biochem* **55**, 397-425.

**Ames, G. F. L., Liu, C. E., Joshi, A. K. & Nikaido, K. (1996).** Liganded and unliganded receptors interact with equal affinity with the membrane complex of periplasmic permeases, a subfamily of traffic ATPases. *J Biol Chem* **271**, 14264-14270.

**Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985).** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**, 411-414.

**Argüelles, J. C. (1997).** Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **146**, 65-71.

**Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1994).** *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley and Sons, Inc.

**Barbour, E. A. & Priest, F. G. (1986).** The preservation of *Lactobacilli*: a comparison of three methods. *Lett Appl Microbiol* **2**, 68-71.

- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. & Engert, A. (2000).** Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1572-1579.
- Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M. & Rees, D. C. (2002).** Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* **298**, 1582-1587.
- Bayles, D. O. & Wilkinson, B. J. (2000).** Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 23-27.
- Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. (1998).** Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigma<sup>B</sup> from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol* **180**, 4547-4554.
- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. (2000).** Role of  $\sigma^B$  in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J Bacteriol* **182**, 7083-7087.
- Beckering, C. L., Steil, L., Weber, M. H. W., Völker, U. & Marahiel, M. A. (2002).** Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**, 6395-6402.
- Bellenger, N., Nissen, P., Wood, T. C. & Segel, I. H. (1968).** Specificity and control of cholin-O-sulfat transport in filamentous fungi. *J Bacteriol* **96**.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. & Goldberg, A. L. (2001).** Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 24261-24267.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bligh, E. G. a. D., W. J. (1959).** A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Boch, J., Kempf, B. & Bremer, E. (1994).** Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**, 5364-5371.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. & Bremer, E. (1996).** Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**, 5121-5129.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S. & Bremer, E. (1997).** Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Archives of Microbiology* **168**, 282-289.
- Bohnert, H. J. (1995).** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**, 1099-1111.
- Bolen, D. W. & Baskakov, I. V. (2001).** The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**, 955-963.

- Boncompagni, E., Osteras, M., Poggi, M. C. & le Rudulier, D. (1999).** Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2072-2077.
- Booth, I. R. & Louis, P. (1999).** Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 166-169.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J. & Santos, H. (2002).** Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**, 209-216.
- Bösser, L. (2001).** Das Substratbindeprotein (ProX) des ABC-Transporters ProU aus *Escherichia coli*: Gerichtete Mutagenese. Diplomarbeit. Marburg: Philipps-Universität.
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touze, T., Wu, L. F., Blanco, C. & Bernard, T. (2000).** Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 1050-1056.
- Bovell, C. R., Helgerson, R. & Packer, L. (1963).** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light-scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**, 257-265
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braun, V. & Wu, H. C. (1994).** Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export. In *Bacterial cell wall*. Edited by J.-M. Ghuysen & R. Hakenbeck. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.
- Breed, J., Kneip, S., Gade, J., Welte, W. & Bremer, E. (2001).** Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the periplasmic binding protein ProX from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 448-450.
- Bremer, E. & Krämer, R. (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in Bacteria. In *Bacterial stress responses*, pp. 79-97. Edited by G. Storz & R. Hengge-Aronis. Washington, D.C.: ASM Press.
- Brill, J. (1998).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Marburg: Philipps Universität.
- Brill, J. (2001).** Biosynthese und Anhäufung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.
- Brill, J. & Bremer, E. (2002).** A separate biosynthetic pathway mediates accumulation of the compatible solute proline in response to hypertonicity in *Bacillus subtilis*. *Manuskript in Vorbereitung*.



**Brown, A. D. (1963).** The peripheral structures of Gram-negative bacteria. IV. The cation sensitive dissolution of the cell membrane of the halophilic bacterium, *Halobacterium halobium*. *Biochim Biophys Acta* **75**, 425-435.

**Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**, 803-846.

**Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A. & Richarme, G. (1999).** Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* **145** ( Pt 9), 2543-2548.

**Calhoun, C. L. & Frazier, W. C. (1966).** Effect of available water on the thermal resistance of three nonsporeforming species of bacteria. *Applied Microbiology* **14**, 416-420.

**Canovas, D., Fletcher, S. A., Hayashi, M. & Csonka, L. N. (2001).** Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **183**, 3365-3371.

**Casadaban, M. J. (1976).** Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* **104**, 541-555.

**Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T. & Rees, D. C. (1998).** Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-2226.

**Chen, T. H. & Murata, N. (2002).** Enhancement of tolerance against abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 250-257.

**Ciulla, R. A., Burggraf, S., Stetter, K. O. & Roberts, M. F. (1994).** Occurrence and role of Di-myo-inositol-1,1'-phosphate in *Methanococcus igneus*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3660-3664.

**Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. & Record, M. T., Jr. (2000).** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**, 4455-4471.

**Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F. & Aurel Wistrom, C. (1987).** Stabilisation of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* **242**, 1-10.

**Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C. & Appel, L. (1985).** Preservation of freeze dried liposomes by trehalose. *Arch Biochem Biophys* **242**, 240-247.

**Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**, 121-147.

**Csonka, L. N. & Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, pp. 1210-1223. Edited by N. F. e. al. Washington DC: ASM Press.

**Culham, D. E., Tripet, B., Racher, K. I., Voegelé, R. T., Hodges, R. S. & Wood, J. M. (2000).** The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J Mol Recognit* **13**, 309-322.

**da Costa, M. S., Santos, H. & Galinski, E. A. (1998).** An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**, 117-153.

**Daniel, R. M., Dines, M. & Petach, H. H. (1996).** The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem J* **317**, 1-11.

**Dattananda, C. S. & Gowrishankar, J. (1989).** Osmoregulation in *Escherichia coli*: complementation analysis and gene-protein relationships in the *proU* locus. *J Bacteriol* **171**, 1915-1922.

**de Virgilio, C., Hottinger, T., Dominguez, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1994).** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal of Biochemistry* **219**, 179-186.

**Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 90-104.

**Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R. A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Baumer, S., Jacobi, C., Bruggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bomeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H. P., Gunsalus, R. P., Fritz, H. J. & Gottschalk, G. (2002).** The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 453-461.

**Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. & Goloubinoff, P. (2001).** Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**, 39586-39591.

**Diez, J., Diederichs, K., Grellér, G., Horlacher, R., Boos, W. & Welte, W. (2001).** The crystal structure of a liganded trehalose/maltose-binding protein from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* at 1.85 Å. *J Mol Biol* **305**, 905-915.

**Double, S. (1997).** Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol* **276**, 523-530.

**Dougherty, D. A. (1996).** Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, phe, tyr and trp. *Science* **271**, 163-168.

**Dowhan, W. (1997).** Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids. *Annu Rev Biochem* **66**, 199-232.

**Dulaney, E. L., Dulaney, D. D. & Rickes, E. L. (1968).** Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined media of high osmolarity. *Dev Ind Microbiol* **9**, 260-269.

**Eisenberg, H. & Wachtel, E. J. (1987).** Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**, 69-92.

- Epstein, W. (1986).** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 73-78.
- Fabry, S. & Hensel, R. (1987).** Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *Eur J Biochem* **165**, 147-155.
- Fekkes, P. & Driessen, A. J. (1999).** Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 161-173.
- Fletcher, S. A. & Csonka, L. N. (1998).** Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* **15**, 307-317.
- Fletcher, S. A., Rhodes, D. & Csonka, L. N. (2001).** Analysis of the effects of osmoprotectants on the high osmolality-dependent induction of increased thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **18**, 345-354.
- Gadd, G. M., Chalmers, K. & Reed, R. H. (1987).** The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **48**, 249-254.
- Galinski, E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**, 272-328.
- Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 95-108.
- Gauthier, M., Fatau, G., Munro, P. & RL, C. (1993).** Glutamate uptake and synthesis by *Escherichia coli* cells in seawater: effects on culturability loss and glycine betaine transport. *Microb Releases* **2**, 53-59.
- Goepfert, J. M., Iskander, I. K. & Amunson, C. H. (1970).** Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. *Appl Environ Microbiol* **19**, 429-433.
- Gowrishankar, J. (1986).** ProP-mediated proline transport also plays a role in *Escherichia coli* osmoregulation. *J Bacteriol* **166**, 331-333.
- Gowrishankar, J. (1989).** Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 1923-1931.
- Gowrishankar, J. & Manna, D. (1996).** How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**, 363-378.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. & Bremer, E. (1995).** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **246**, 783-786.
- Haarwood, C. R. & Archibald, A. R. (1990).** Growth, maintenance and general techniques. In *Molecular biological methods for Bacillus*. Edited by C. R. Haarwood & S. M. Cutting. Chichester, U.K.: John Wiley&Sons Ltd.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

**Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990).** Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **22**, 451-471.

**Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417-428.

**Hecker, M. & Volker, U. (2001).** General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**, 35-91.

**Helmann, J. D. (1995).** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 2351-2360.

**Hendrick, J. P. & Hartl, F. U. (1993).** Molecular chaperone function of heat shock proteins. *Annu Rev Biochem* **62**, 349-384.

**Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. & Boos, W. (1991).** Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 7918-7924.

**Higgins, C. F. (1992).** ABC-transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.

**Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K. & Takano, H. (1990).** Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1386-1391.

**Höltje, V. J. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 181-203.

**Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi, N. & Bremer, E. (accepted for publication).** KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup>-uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in the adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol*.

**Horlacher, R., Xavier, K. B., Santos, H., DiRuggiero, J., Kossmann, M. & Boos, W. (1998).** Archaeal binding protein-dependent ABC transporter: molecular and biochemical analysis of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Bacteriol* **180**, 680-689.

**Hottinger, T., Boller, T. & Wiemken, A. (1987).** Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes in trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett* **220**, 113-115.

**Hottinger, T., Boller, T. & Wiemken, A. (1989).** Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? *FEBS Lett* **255**, 259-263.

**Inukai, M., Enokita, R., Torikata, A., Nakahara, M., Iwado, S. & Arai, M. (1978).** Globomycin, a new peptide antibiotic with spheroplast-forming activity. I. Taxonomy of producing organisms and fermentation. *J Antibiot* **31**, 410-420.

**Jaenicke, R. (1998).** What ultrastable globular proteins teach us about protein stability. *Biochemistry* **63**, 312-321.

- Jaenicke, R. & Bohm, G. (1998).** The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 738-748.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. & Blanco, C. (1992).** Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**, 5027-5035.
- Jebbar, M., von Blohn, C. & Bremer, E. (1997).** Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* **154**, 325-330.
- Kappes, R. M. & Bremer, E. (1998).** Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity - uptake of carnitine, crotonobetaine and  $\gamma$ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83-90.
- Kappes, R. M., Kempf, B. & Bremer, E. (1996).** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**, 5071-5079.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. & Bremer, E. (1999).** Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**, 203-216.
- Kates, M. (1993).** Membrane lipids of archaea. In *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Edited by M. Kates, D. J. Kushner & A. T. Matheson. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1995).** OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**, 16701-16713.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1998a).** Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and synthesis of osmoprotectants. *J Biosci* **23**, 447-455.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1998b).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* **170**, 319-330.
- Kempf, B., Gade, J. & Bremer, E. (1997).** Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J Bacteriol* **179**, 6213-6220.
- Kerres, A. (2002).** Die Rolle von Glutamat bei der Anpassung von *Bacillus subtilis* an hohe Osmolarität. Diplomarbeit. Marburg: Philipps-Universität.
- Kleber, H.-P. (1997).** Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol Lett* **147**, 1-9.

- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C. & et al. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-370.
- Knapp, S., Ladenstein, R. & Galinski, E. A. (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**, 191-198.
- Ko, R., Tombras, L. & Smith, G. M. (1994). Glycine Betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **176**, 426-431.
- Koch, A. L. (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microb Physiol* **24**, 301-366.
- Kuhlmann, A. U. (2002). Biosynthese und Transport des kompatiblen Soluts Ectoin in *Bacillus* ssp. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.
- Kuhlmann, A. U. & Bremer, E. (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**, 772-783.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
- Kunte, J., Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1993). A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Meth* **17**, 129-136.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M. Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C. & Santos, H. (2000). Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1974-1979.
- Lamosa, P., Martins, L. O., Da Costa, M. S. & Santos, H. (1998). Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3591-3598.
- Leisinger, T. (1996). Biosynthesis of proline. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, pp. 434-441. Edited by C. F. Neidhardt. Washington DC: ASM Press.

- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. & Booth, I. R. (1999).** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo J* **18**, 1730-1737.
- Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. (2002).** The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091-1098.
- Lucht, J. M. & Bremer, E. (1994).** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system *proU*. *FEMS Microbiol Rev* **14**, 3-20.
- Martinac, B. (2001).** Mechanosensitive channels in procaryotes. *Cell Physiol Biochem* **11**, 61-76.
- Majumdar, D., Avissar, Y. J. & Wyche, J. H. (1991).** Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA. *Biotechniques* **11**, 94-101.
- Malin, G. & Lapidot, A. (1996).** Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**, 385-395.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A. & Roberts, M. F. (1999).** Osmoadaptation in archaea. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1815-1825.
- Martins, L. O., Carreto, L. S., Da Costa, M. S. & Santos, H. (1996).** New compatible solutes related to Di-myo-inositol-phosphate in members of the order *Thermotogales*. *J Bacteriol* **178**, 5644-5651.
- Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., DaCosta, M. S. & Santos, H. (1997).** Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. *Appl Environ Microbiol* **63**, 896-902.
- Martins, L. O. & Santos, H. (1995).** Accumulation of Mannosylglycerate and Di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3299-3303.
- Mattar, S., Scharf, B., Kent, S. B. H., Rodewald, K., Oesterhelt, D. & Engelhard, M. (1994).** The primary structure of halocyanin, an archaeal blue copper protein, predicts a lipid anchor for membrane fixation. *J Biol Chem* **269**, 14939-14945.
- Mazur, P. (1968).** Survival of fungi after freezing and dessication. In *The Fungi*, pp. 325-394. Edited by G. C. Ainsworth & A. S. Sussman. New York: Academic Press.
- Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics - A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, K. J. & Wood, J. M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 101-136.

- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F. X. & Schumann, W. (1997).** The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* **16**, 4579-4590.
- Moses, S. (1999).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.
- Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T. & Bakker, E. P. (1998).** KtrAB, a new type of bacterial K<sup>+</sup>-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **180**, 3491-3494.
- Narberhaus, F. (1999).** Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* **31**, 1-8.
- Nau-Wagner, G. (1999).** Physiologische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese und Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Marburg: Philipps Universität.
- Nau-Wagner, G., Boch, J., Le Good, J. A. & Bremer, E. (1999).** High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 560-568.
- Nunes, O. C., Manaia, C. M., Dacosta, M. S. & Santos, H. (1995).** Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2351-2357.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J. C., Renault, P., Bolotin, A. & Mistou, M. Y. (1999).** Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol* **181**, 6238-6246.
- Oren, A. (1990).** Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamin in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **58**, 291-298.
- Patchett, R. A., Kelly, A. F. & Kroll, R. G. (1994).** Transport of glycine betaine by *Listeria monocytogenes*. *Archives of Microbiology* **162**, 205-210.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K. & Saier Jr., M. H. (1998).** Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *Journal of Molecular Biology* **277**, 573-593.
- Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C. & Krämer, R. (1997).** Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes. *Archives of Microbiology* **168**, 143-151.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. & Morbach, S. (1998).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**, 6005-6012.



- Peter, H., Burkovski, A. & Krämer, R. (1998).** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **273**, 2567-2574.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U. & Hecker, M. (2001).** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**, 5617-5631.
- Piper, P. W., Emson, C., Cowan, D. A., Fleming, T. M. & Littlechild, J. A. (1996).** Complementation of a *pgk* deletion mutation in *Saccharomyces cerevisiae* with expression of the phosphoglycerate-kinase gene from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Current Genetics* **29**, 594-596.
- Pollard, A. & Wyn Jones, R. G. (1981).** Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **144**, 291-298.
- Poolman, B. & Glaasker, E. (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**, 397-407.
- Potts, M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**, 755-805.
- Price, C. W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K. & Youngman, P. (2001).** Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**, 757-774.
- Proctor, L. M., Lai, R. & Gunsalus, R. P. (1997).** The methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1 possesses a high-affinity glycine betaine transporter involved in osmotic adaptation. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2252-2257.
- Quiocho, F. A. & Ledvina, P. S. (1996).** Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* **20**, 17-25.
- Racher, K. I., Voegelé, R. T., Culham, D. E., Wood, J. M., Jung, H., Bacon, M., Cairns, M. T., Ferguson, S. M., Liang, W.-J., Henderson, P. J. F., White, G. & Hallett, F. R. (1999).** Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic upshifts. *Biochemistry* **38**, 1676-1684.
- Richarme, G. & Kepes, A. (1983).** Study of binding protein-ligand interaction by ammonium sulfate-assisted adsorption on cellulose esters filters. *Biochim Biophys Acta* **742**, 16-24.
- Roberts, M. F. (2000).** Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci* **5**, D796-812.
- Robertson, D. E., Noll, D., Roberts, M. F., Menaia, J. A. & Boone, D. R. (1990).** Detection of the osmoregulator betaine in methanogens. *Appl Environ Microbiol* **56**, 563-565.
- Roessler, M. & Müller, V. (2001).** Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology* **3**, 743-754.
- Roessler, M., Pflüger, K., Flach, H., Lienard, T., Gottschalk, G. & Müller, V. (2002).** Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Gö1. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2133-2139.

**Ron, E. Z. & Davis, B. D. (1971).** Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine. *J Bacteriol* **107**, 391-396.

**Rübenhagen, R., Morbach, S. & Krämer, R. (2001).** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>. *Embo J* **20**, 5412-5420.

**Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R. & Morbach, S. (2000).** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem* **275**, 735-741.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

**Sankaran, K. & Wu, H. C. (1993).** Bacterial lipoproteins. In *Lipid modifications of proteins*, pp. 163-181. Edited by M. J. Schlesinger. St. Louis, Missouri: CRC Press.

**Santos, H. & da Costa, M. S. (2001).** Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. *Methods Enzymol* **334**, 302-315.

**Santos, H. & Da Costa, M. S. (2002).** Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology* **4**, 501-509.

**Schiefner, A., Breed, J., Bösner, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W. & Bremer, E. (in Vorbereitung).** Structure of the osmoprotectant binding protein ProX from *Escherichia coli* at 1.6 Å resolution : cation- $\pi$  interactions as determinants of glycine betaine and proline betaine binding.

**Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schafer, W. & Hensel, R. (1992).** Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett* **306**, 239-242.

**Sharff, A. I., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. & Quijcho, F. A. (1992).** Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* **31**, 10657-10663.

**Shilton, B. H., Flocco, M. M., Nilsson, M. & Mowbray, S. L. (1996).** Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribose binding proteins. *J Mol Biol* **264**, 350-363.

**Shima, S., Herault, D. A., Berkessel, A. & Thauer, R. K. (1998).** Activation and thermostabilization effects of cyclic 2,3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Archives of Microbiology* **170**, 469-472.

**Silva, Z., Borges, N., Martins, L. O., Wait, R., da Costa, M. S. & Santos, H. (1999).** Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles* **3**, 163-172.

- Simione, F. P. & Brown, E. M. (1991).** *ATCC preservation methods: freezing and freeze drying*. Rockville, MD: American Type Culture Collection.
- Singer, M. A. & Lindquist, S. (1998).** Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cell* **1**, 639-648.
- Skerra, A. (1994).** Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T. & Hill, C. (1999).** Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2078-2083.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., O'Driscoll, B. & Hill, C. (2000).** Analysis of the role of *betL* in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int J Food Microbiol* **60**, 261-268.
- Sleator, R. D. & Hill, C. (2002).** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 49-71.
- Smith, C. J., Deutch, A. H. & Rushlow, K. E. (1984).** Purification and characteristics of a  $\gamma$ -glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *J Bacteriol* **157**, 545-551.
- Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. & Le Rudulier, D. (1988).** Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **170**, 3142-3149.
- Spaller, S. (1999).** Transport und Nutzung von kompatiblen Soluten bei der Kälteanpassung in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Marburg: Philipps Universität.
- Spiegelhalter, F. (1999).** Die transkriptionell kontrollierte Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis* am Beispiel der Prolin- und Glycin-Betain-Transportsysteme OpuE und OpuD. Dissertation. Marburg: Philipps Universität.
- Spiegelhalter, F. & Bremer, E. (1998).** Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol Microbiol* **29**, 285-296.
- Spizizen, J. (1958).** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* with deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 1072-1078.
- Sterner, R. & Liebl, W. (2001).** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 39-106.
- Stetter, K. O. (1988).** *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria. *Syst Appl Microbiol* **10**, 172-173.
- Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M. & Neuner, A. (1987).** Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers evidence for a novel branch of archaebacteria. *Science* **236**, 822-824.

- Stirling, D. A., Hulton, C. S., Waddell, L., Park, S. F., Stewart, G. S., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1989).** Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol Microbiol* **3**, 1025-1038.
- Strumpp, T., Wilms, B. & J., A. (2001).** Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* **1**, 33-36.
- Sutcliffe, J. C. & Russel, R. R. B. (1995).** Lipoproteins of Gram positive bacteria. *J Bacteriol* **177**.
- Szilagyi, A. & Zavodszky, P. (2000).** Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure Fold Des* **8**, 493-504.
- Tam, R. & Saier, M. H. (1993).** Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 320-346.
- Tatzelt, J., Prusiner, S. B. & Welch, W. J. (1996).** Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J* **15**, 6363-6373.
- Tesone, S., Hughes, A. & Hurst, A. (1981).** Salt extends the upper temperature limit for growth of food-poisoning bacteria. *Can J Microbiol* **27**, 970-972.
- Thomm, M., Madon, J. & Stetter, K. O. (1986).** DNA-dependent RNA polymerase of the three orders of methanogens. *Biological Chemistry* **367**, 473-481.
- Timasheff, S. N. (1998).** Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem* **51**, 355-432.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Umbarger, H. E. (1978).** Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* **47**, 533-606.
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J., Da Costa, M. S. & Konings, W. N. (1999).** Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochim Biophys Acta* **1419**, 97-104.
- van der Heide, T. & Poolman, B. (2000).** Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7102-7106.
- van der Heide, T. & Poolman, B. (2000).** Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriol* **182**, 203-206.
- van der Heide, T. & Poolman, B. (2002).** ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* **3**, 938-943.

- van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1993).** Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* **229**, 105-124.
- Velasco, R., Burgoa, R., Flores, E., Hernandez, E., Villa, A. & Vaca, S. (1995).** Osmoregulation in *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic shock. *Rev Latinoam Microbiol* **37**, 209-216.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 504-544.
- Verheul, A., Glaasker, E., Poolman, B. & Abee, T. (1997).** Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *J Bacteriol* **179**, 6979-6985.
- Vogel, H. J. & Davis, B. D. (1952).** Glutamic- $\gamma$ -semialdehyde and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylic-acid, intermediates in the biosynthesis of proline. *J Am Chem Soc* **74**, 109-112.
- Völker, U., Maul, B. & Hecker, M. (1999).** Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 3942-3948.
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M. & Bremer, E. (1997).** Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**, 175-187.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Wassenberg, D., Liebl, W. & Jaenicke, R. (2000).** Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J Mol Biol* **295**, 279-288.
- Welsh, D. T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 263-290.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Wouters, J. A., Sleator, R. D., Gahan, C. G., Hill, C. & Abee, T. (2002).** Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4710-4716.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. & Reed, R. H. (1990).** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**, 2527-2535.
- Whatmore, A. M. & Reed, R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**, 2521-2526.
- White, B. A. (1993).** PCR-protocols. In *Methods in Microbiology*. Edited by J. M. Walker. Totawa, NJ: Humana Press.

**Winzor, C. L., Winzor, D. J., Paleg, L. G., Jones, G. P. & Naidu, B. P. (1992).** Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Arch Biochem Biophys* **296**, 102-107.

**Wood, J. M. (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 230-263.

**Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. & Santos, H. (1996).** High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Bacteriol* **178**, 4773-4777.

**Yuan, G. & Wong, S. L. (1995).** Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the  $\sigma^A$ -like promoter and the roles of the inverted repeat sequence CIRCE. *J Bacteriol* **177**, 5427-5433.

**Zhilana, T. N. & Zavarzin, G. A. (1990).** Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**, 315-322.